

Bioacumulação de Cianotoxinas em Microalgas e Plantas – Uma Abordagem Laboratorial para a Avaliação de Risco de Cianobactérias Tóxicas

Catarina Isabel Barros dos Santos

Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água

Departamento de Biologia

Ano Lectivo 2013/2014

Orientador

Dr. Alexandre Marnoto de Oliveira Campos
Investigador Auxiliar, CIIMAR

Coorientador

Dr^a Ana Luísa Frazão Pereira
Pós-Doutoranda, CIIMAR



U. PORTO

FC **FACULDADE DE CIÊNCIAS**
UNIVERSIDADE DO PORTO

Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____

N

S

O

Agradecimentos

Ao Doutor Alexandre Campos, pela oportunidade de integração no laboratório de Ecotoxicologia, Genómica e Evolução (LEGE), por toda a ajuda, disponibilidade, partilha de conhecimentos e interesse demonstrados no decorrer deste ano.

À Doutora Ana Luísa Pereira, por todo o acompanhamento, disponibilidade, profissionalismo, por todas as críticas que me fizeram evoluir, por estar sempre presente nos momentos mais difíceis e por todo o conhecimento transmitido. Um muito obrigada nunca será o suficiente.

Ao Doutor Aldo Barreiro Felpeto, por todo o auxílio prestado na análise estatística. A sua ajuda foi fundamental.

À Doutora Mafalda Baptista, por me ter acompanhado e ajudado na quantificação de ácidos orgânicos, muito obrigada pela disponibilidade e paciência.

À Joana Azevedo, pela ajuda na análise das amostras em HPLC, transmissão de novos conhecimentos e simpatia sempre presente.

À colega Joana Machado, pelo companheirismo e por gentilmente ter cedido o extrato bruto de *Mycrocystis aeruginosa*, fundamental para a execução dos meus bioensaios.

A todos os membros do LEGE, por toda a ajuda e boa disposição.

Em particular, no LEGE,

À Ana Matos, por se ter revelado uma pessoa fantástica e uma ótima amiga, obrigada por todo o apoio nos momentos de desânimo, pelo companheirismo no decorrer deste ano e pela partilha de bons momentos.

Aos colegas de laboratório, Susana Cruz, Catarina Caetano, Rita Mendes, Tiago Azevedo, Tiago Afonso pelo companheirismo, sugestões, motivação e bom-humor.

Às colegas Carina, Catarina, Rebeca e Zita do Laboratório de Hidrologia e Bromatologia da FFUP por todo o apoio e amizade.

A todos os meus amigos, que lidaram comigo e aturaram a minha bipolaridade durante todo este percurso. Obrigada por todas as palavras de apoio, por todos os momentos únicos e pela vossa amizade.

A toda a minha família, em especial ao meu avô Neca por permanecer na minha vida e à minha avó Maria, por tudo o que me deu e por tudo o que representa e continuará a representar para mim.

Aos meus pais, que fizeram de mim o que sou hoje e a quem não consigo agradecer o suficiente toda a dedicação, esforço, apoio, amizade e inspiração em todos os momentos da minha vida, a eles dedico este trabalho.

Resumo

As cianobactérias tóxicas são conhecidas como uma ameaça ambiental emergente podendo hoje em dia ser encontradas por todo o mundo, quer em água doce como salobra ou até mesmo salgada, causando a sua contaminação e desta forma representando um sério risco para a saúde pública.

Vários estudos já demonstraram os efeitos tóxicos das cianotoxinas em fitoplâncton e em macrófitas, alterando as suas taxas de crescimento, causando stress oxidativo e problemas de germinação. Sendo que estes dois organismos estão na base da cadeia alimentar para vários organismos aquáticos, estes podem acumular e transferir estas toxinas para níveis tróficos superiores.

Três bioensaios foram realizados, sendo que no primeiro foi usado extrato bruto de *Aphanizomenon ovalisporum* contendo cilindrospermopsina (0,055 e 0,150 µg/mL) e extrato bruto de *Microcystis aeruginosa* contendo microcistina-LR (0,055 e 0,150 µg/mL) em *Chlorella vulgaris* (densidade celular de 1×10^5 céls/mL), no segundo bioensaio apenas foi utilizado extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo cilindrospermopsina (0,05, 0,5 e 5 µg/mL) em *Azolla filiculoides*, no terceiro ensaio foi também usado extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo cilindrospermopsina (0,150 µg/mL) em diferentes concentrações de meio Z8 ($\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, nitrato e fosfato em duplicado e todos os nutrientes em duplicado) em *C. vulgaris*. O primeiro e o terceiro ensaio com a *C. vulgaris* decorreram durante 14 dias e o segundo ensaio com *A. filiculoides* decorreu durante 7 dias.

A taxa de crescimento da *A. filiculoides* diminuiu drasticamente na concentração de 5 µg CYN/mL comparativamente com o controlo. Houve um aumento em clorofila *a* e *b* e carotenóides na concentração mais elevada (5 µg CYN/mL). No que diz respeito às ficobiliproteínas, não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas. O conteúdo em proteínas foi mais elevado na concentração de 5 µg CYN/mL. Relativamente às enzimas do sistema antioxidativo a única diferença estatisticamente significativa foi na glutathione-S-transferase e glutathione redutase na concentração de 5 µg/mL quando comparado com o controlo. O fator de bioconcentração (FBC) demonstrou que existia toxina no pteridófito mas não em quantidade suficiente para ser considerada como bioacumulação (FBC <1).

Os bioensaios realizados com a microalga *C. vulgaris* demonstraram que a taxa de crescimento parcial diminuía a partir do 6º dia e que os tratamentos com CYN, MC-LR e meio Z8 modificado não afetaram a taxa de crescimento parcial da microalga quando comparado com o controlo. A quantificação de carotenóides de todos os ensaios em *C.*

vulgaris revelou que existiam diferenças entre todos os dias (0, 7 e 14) e entre o controlo e tratamento nos ensaios com N e P em duplicados no meio ao 14º dia, sendo que o conteúdo máximo de carotenóides foi sempre visível ao 7º.

Este conjunto de dados mostra que a *C. vulgaris* é fitotolerante a estas cianotoxinas o que pode indicar que outros fatores externos podem estar na origem dos resultados obtidos. O feto *A. filiculoides* mostrou não acumular a cianotoxina não sendo por isso adequado para fitorremediação, contudo pode ser usada como parte de ração para animais.

Palavras chave: *Azolla filiculoides*, carotenóides, *Chlorella vulgaris*, cianobactérias, cianotoxinas, cilindrospermopsina, enzimas antioxidativas, ficobiliproteínas, fitorremediação, microcistina, taxas de crescimento

Abstract

Toxic cyanobacteria are known nowadays as an emerging environmental threat. They can be found all over the world both in freshwater and brackish or even in salt water, contaminating and thus representing a serious risk to public health.

Several studies have demonstrated the toxic effects of cyanotoxins on phytoplankton and macrophytes, altering their growth rates, causing oxidative stress and germination problems. Since these two organisms are the basis of food chain for many other aquatic organisms, they might accumulate and transfer these toxins to higher trophic levels.

Three bioassays were performed, the first using the crude extract of a cylindrospermopsin-producing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* (0,055 and 0,150 µg CYN/mL) and microcystin-producing cyanobacterium *Mycrocystis aeruginosa* (0,055 and 0,150 µg MC-LR/mL) in *Chlorella vulgaris* with a cell density of 1×10^5 cells/mL; the second using the crude extract of a cylindrospermopsin-producing cyanobacterium *A. ovalisporum* (0,05, 0,5 and 5 µg CYN/mL) in *Azolla filiculoides*, and the third bioassay was also using the crude extract of a cylindrospermopsin-producing cyanobacterium *A. ovalisporum* (0,150 µg CYN/mL) in *C. vulgaris* at different concentrations of Z8 medium ($\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, nitrate and phosphate in duplicate and all nutrients duplicate). The first and third bioassays with *C. vulgaris* lasted for 14 days and the second with *A. filiculoides* 7 days.

The growth rate of *A. filiculoides* drastically decreased in the higher concentration (5 µg CYN/mL) when comparing to control. There was an increase in chlorophyll *a* and *b* and carotenoids at the highest concentration (5 µg CYN/mL). Regarding to phycobiliproteins, no statistical significant differences were detected. The protein content was higher at concentration of 5 µg CYN/mL. In relation to antioxidant enzyme system, only glutathione-S-transferase and glutathione reductase were statistically significant at concentration of 5 µg CYN/mL compared to the control. The bioconcentration factor (BCF) showed that there was toxin in pteridophyte but not enough to be considered as bioaccumulation ($BCF < 1$).

The bioassays with the microalga *C. vulgaris* demonstrated that the partial growth rate decreased from the 6th day and the treatments with CYN, MC-LR and modified Z8 medium did not affect the growth rate of the microalga when compared to control. Quantification of carotenoids off all bioassays in *C. vulgaris* revealed significant statistical differences between days of culture (0, 7 and 14 days) and controls and treatments with duplicated N and P nutrients in the medium (14 days of culture), and the higher content of carotenoids was always noticeable at 7th day.

This data shows that *C. vulgaris* is phytotolerant to these cyanotoxins, which might indicate that other external factors may be the cause of this results. The *A. filiculoides* showed no cyanotoxin accumulation and therefore might not be suitable for phytoremediation, however can be used in animal food.

Key words: antioxidative enzymes, *Azolla filiculoides*, carotenoids, *Chlorella vulgaris*, cyanobacteria, cyanotoxins, cylindrospermopsin, growth rate, mycrocistin, phycobiliproteins, phytoremediation

Índice

1. Introdução	1
1.1 Florescências de cianobactérias.....	1
1.2 Cianotoxinas	2
1.2.1 Cilindrospermopsina	2
1.2.2 Microcistina.....	4
1.3 Toxicidade da cianotoxinas em algas e plantas.....	5
1.3.1 Cilindrospermopsina	5
1.3.2 Microcistina.....	6
1.4. Bioacumulação de cianotoxinas	7
1.4.1 Bioacumulação de cilindrospermopsina em algas e plantas.....	7
1.4.2 Bioacumulação de microcistina em algas e plantas	8
1.5 Pteridófito <i>Azolla filiculoides</i>.....	9
1.6 Microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	11
1.7 Fitorremediação de água com <i>A. filiculoides</i> e <i>C. vulgaris</i>	12
1.8 Objetivos	13
2. Materiais e Métodos	14
2.1 Material biológico	14
2.1.1 Cultura de <i>Aphanizomenon ovalisporum</i>	14
2.1.2 Cultura de <i>Chlorella vulgaris</i>	15
2.1.3 Cultura de <i>Azolla filiculoides</i>	16
2.2 Extração de cilindrospermopsina (CYN) de <i>A. ovalisporum</i>	17
2.3 Quantificação de CYN e MC-LR no extrato bruto por <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC)	17
2.3.1 Quantificação de CYN.....	17
2.3.2 Quantificação de MC-LR.....	18
2.4 Bioensaio.....	19
2.4.1 <i>Chlorella vulgaris</i>	19
2.4.2 <i>Azolla filiculoides</i>	23
2.5 Cálculo de parâmetros	24
2.5.1 <i>Chlorella vulgaris</i>	24
2.5.2 <i>Azolla filiculoides</i>	27
2.6. Análise estatística	35

3. Resultados.....	36
3.1 <i>Azolla filiculoides</i>	36
3.1.1 Taxa de crescimento	36
3.1.2 Clorofilas e carotenóides.....	36
3.1.3 Ficobiliproteínas.....	38
3.1.4 Quantificação de proteínas	39
3.1.5 Determinação da atividade das enzimas do sistema antioxidativo	40
3.1.6 Bioconcentração CYN em <i>Azolla filiculoides</i>	42
3.2 <i>Chlorella vulgaris</i>	42
3.2.1 Ensaio de exposição a duas cianotoxinas (CYN e MC-LR) em duas concentrações.....	42
3.2.2 Influência da concentração dos nutrientes do meio de cultura Z8.....	47
4. Discussão.....	52
4.1 <i>Azolla filiculoides</i>	52
4.1.1 Taxa de crescimento	52
4.1.2 Clorofilas e carotenóides.....	52
4.1.3 Ficobiliproteínas.....	53
4.1.4 Proteínas	54
4.1.5 Atividade das enzimas do sistema antioxidativo.....	54
4.2 <i>Chlorella vulgaris</i>	55
4.2.1 Bioensaio de exposição ao extrato bruto de <i>A. ovalisporum</i>	55
4.2.2 Bioensaio de exposição ao extrato bruto de <i>M. aeruginosa</i>	56
4.2.3 Bioensaio de exposição ao extrato bruto de <i>A. ovalisporum</i> no meio Z8 modificado	57
4.2.4 Quantificação de carotenóides	58
4.2.5 Ácidos orgânicos.....	59
4.3 Fitorremediação.....	60
5. Conclusão	63
6. Referências.....	65

Lista de tabelas

Tabela 2.1- Soluções <i>stock</i> para a elaboração do meio Z8.....	15
Tabela 2.2- Meio de cultura Hoagland (H-40).....	16
Tabela 2.3- Reagentes adicionados aos brancos para determinação da CAT.....	30
Tabela 2.4- Reagentes adicionados ao branco e à amostra para determinação da POD.....	31
Tabela 2.5- Reagentes adicionados ao branco e à amostra para determinação da GR.....	32
Tabela 2.6- Reagentes adicionados ao branco e à amostra para determinação da GSH.....	33
Tabela 2.7- Reagentes adicionados ao branco e à amostra para determinação da GPx.....	34
Tabela 3.1- Concentração de fator de bioconcentração (FBC) de CYN nos esporófitos de <i>A. filiculoides</i>	42
Tabela 3.2- Quantificação do ácido succínico no meio Z8.....	47

Lista de figuras

Figura 1.1- Massa de água eutrofizada.....	1
Figura 1.2- Estrutura molecular da CYN.....	3
Figura 1.3- Estrutura molecular da MC-LR com a posição de cada aminoácido.....	5
Figura 1.4- Pteridófito de <i>A. filiculoides</i>	9
Figura 1.5- Reprodução sexuada do pteridófito de <i>A. filiculoides</i>	10
Figura 1.6- Microalga <i>C. vulgaris</i>	11
Figura 2.1- Filamento de <i>A. ovalisporum</i>	14
Figura 2.2- Cromatograma de CYN de um padrão e do extrato bruto de <i>A. ovalisporum</i>	18
Figura 2.3- Cromatograma de MC-LR de um padrão e do extrato bruto de <i>M. aeruginosa</i>	20
Figura 2.4- Esquema do procedimento do bioensaio realizado com <i>C. vulgaris</i>	21
Figura 2.5- Esquema do procedimento do Bioensaio realizado com <i>C. vulgaris</i> em meio Z8 modificado.....	22
Figura 3.1- Taxa de crescimento relativo de <i>A. filiculoides</i>	36
Figura 3.2- Clorofilas e carotenóides de <i>A. filiculoides</i> após 7 dias de exposição a diferentes concentrações de extrato.....	37
Figura 3.3- Conteúdo em ficobiliproteínas em <i>A. azollae</i>	39
Figura 3.4- Concentração de proteína em <i>A. filiculoides</i>	40
Figura 3.5- Atividade das enzimas antioxidativas de <i>A. filiculoides</i>	41
Figura 3.6- Taxa de crescimento parcial de <i>C. vulgaris</i>	43
Figura 3.7- Quantificação de carotenóides em <i>C. vulgaris</i>	45
Figura 3.8- Quantificação de CYN e MC-LR no meio de cultura de <i>C. vulgaris</i> exposta aos extratos brutos.....	46
Figura 3.9- Taxa de crescimento parcial dos ensaios em meio Z8 modificado.....	48
Figura 3.10- Quantificação de carotenóides.....	49

Figura 3.11- Quantificação de CYN nos meios de cultura.....	50
--	----

Lista de abreviaturas

APC - Aloficocianina
Car_{x+c} – Carotenóides
Cl_a – Clorofila *a*
Cl_b – Clorofila *b*
CYN – Cilindrospermopsina
ETA – Estação de tratamento de água
ETAR – Estação de tratamento de água residual
FBC – Fator de bioconcentração
HPLC – High Pressure Liquid Chromatography
HPLC-PDA - High Pressure Liquid Chromatography Photodiode Array
LEGE – Laboratório de Ecotoxicologia Evolução e Genómica
LOD – Limite ótimo de detecção
LOQ – Limite ótimo de quantificação
LPO – Peroxidação lipídica
MC - Microcistina
MC-LR - Microcistina-LR
NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
OATP- Polipéptidos transportadores de aniões orgânicos
PBP – Ficobiliproteínas
PC – Ficocianina
PEC – Ficoeritrocianina
PF – Peso fresco
ROS – Espécies reactivas de oxigénio
TCR – Taxa de crescimento relativo
TFA - Ácido trifluoroacético
Z8 ½ - Meio Z8 contendo um meio dos nutrientes
Z8 ¼ - Meio Z8 contendo um quarto dos nutrientes
Z8 N, F 2x – Meio Z8 com nitrato e fosfato em duplicado
Z8 2xN – Meio Z8 com todos os nutrientes em duplicado

1. Introdução

1.1 Florescências de cianobactérias

As cianobactérias, normalmente denominadas por algas azuis-verdes, são procariontes fotossintéticos. Estes organismos, são conhecidos pela frequente formação de florescências em águas eutrofizadas (Fig. 1.1) O aparecimento de florescências em águas doces, salobras e em ecossistemas marinhos deve-se a vários fatores, entre os quais, a luminosidade, alterações climáticas, o aumento da temperatura global e o aumento da carga de nutrientes (p.e., nitratos e fosfatos) resultante do uso excessivo de fertilizantes agrícolas. Outras causas podem não só ser antropogénicas (descargas ilegais) como também se podem dever às estações de tratamento de águas residuais (ETARs) que muitas vezes não possuem mecanismos suficientes para descontaminação total dos efluentes. O mesmo se passa nas estações de tratamento de água (ETAs) caso captem água contaminada de um rio ou reservatório e não possuam os mecanismos de desinfecção e tratamento (Vasconcelos et al., 2001).

Algumas espécies de cianobactérias podem produzir cianotoxinas. Embora numa fase inicial da sua formação, as toxinas sejam maioritariamente endotoxinas, ou seja, permaneçam no interior das células, aquando da senescência ou lise celular, as toxinas são libertadas para o meio aquático e, desta forma, colocam em risco diversos organismos aquáticos (Saqrane et al., 2007) tornando-se numa ameaça global à saúde pública e aos organismos aquáticos (O'Neil et al., 2012).

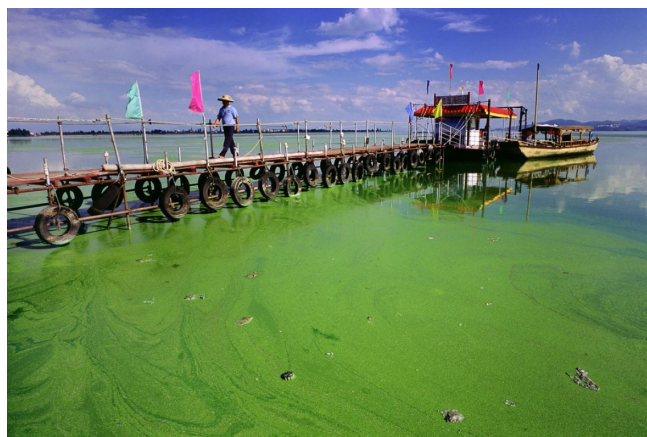


Fig. 1.1 Massa de água eutrofizada (<http://followgreenliving.com>)

A contaminação das águas superficiais por estas toxinas pode provocar problemas na qualidade da água, interferindo com diferentes sectores, nomeadamente pesca, aquacultura, agricultura, entre outros, representando um perigo para humanos e animais. O ser humano pode ser exposto a estas toxinas por várias vias, como por exemplo ingestão de água e alimentos contaminados ou até por contacto dérmico durante atividades recreativas.

1.2 Cianotoxinas

Os compostos tóxicos produzidos pelas cianobactérias são metabolitos secundários que estão classificados consoante os efeitos em animais, órgãos, tecidos e células. Assim, estas toxinas cianobacterianas são classificadas em cinco grupos: as neurotoxinas, hepatotoxinas, citotoxinas, dermatotoxinas e toxinas irritantes (lipopolissacarídeos) (Wiegand & Pflugmacher, 2005).

1.2.1 Cilindrospermopsina

A cilindrospermopsina (CYN) (Fig. 1.2) é um alcalóide que possui uma guanina cíclica ligada ao grupo hidroximetiluracil. Como é uma molécula zwitteriónica, altamente solúvel em água devido à carga positiva do grupo guanidina e à carga negativa do grupo fosfato (Falconer et al., 2006), apresenta grande estabilidade à luz solar, temperatura elevada e oscilações de pH (Chiswell et al. 1999). Até à data, são apenas conhecidas três variantes de CYN que ocorrem naturalmente - cilindrospermopsina, 7-epicylindrospermopsina (7-epi-CYN) e 7-deoxycilindrospermopsina (7-deoxy-CYN). Contudo é ainda incerta a origem da 7-epi-CYN e da 7-deoxy-CYN podendo ser precursores, variantes ou produtos de degradação da CYN (Banker et al., 2000; Li et al., 2006; Seifert et al., 2007; Cruz et al., 2013).

Embora tenha sido inicialmente isolada da *Cylindrospermopsis raciborskii* (Ohtani et al., 1992), esta cianotoxina é produzida por diversas espécies de cianobactérias de água doce, como a *Anabaena bergeii*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Raphidiopsis curvata* e *Umezakia natans* (Ohtani et al., 1992; Harada et al., 1994; Banker et al., 1997; Li et al., 2001; Shembri et al., 2001). Outras espécies produtoras de cilindrospermopsina foram referidas por Pearson et al. (2010) como é o caso de *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena lapponica*, e *Lyngbya wollei*.

Estas espécies podem formar florescências quando os níveis de azoto e fósforo aumentam e/ou quando há um aumento da temperatura e luminosidade, levando a uma reprodução em massa de cianobacterias que perduram por vários dias. *C. raciborskii* e *A. ovalisporum* foram inicialmente descritas como espécies raras na Europa. Contudo, estas espécies tem tido um aumento progressivo em vários países da Europa, incluindo Portugal (Saker et al., 2003).

A sua toxicidade deve-se ao grupo funcional uracilo e aos anéis tricíclicos de guanidina (Runnegar et al., 2002). Estudos *in vitro* com esta cianotoxina pura demonstraram que inibe a síntese da glutathione e a síntese proteica (Runnegar et al., 1994). A rápida toxicidade parece ser mediada pelos metabolitos gerados pelo citocromo P450 (CYP450) enquanto que a toxicidade a longo prazo se deve à inibição da síntese proteica. Segundo Humpage et al. (2000), Falconer & Humpage (2001) e Bazin et al. (2010) esta cianotoxina demonstrou também ter efeitos carcinogénicos e mutagénicos. Estudos recentes mostram a toxicidade ambiental para com diferentes grupos de organismos, onde se incluem as plantas (Metcalf et al., 2004), os gastrópodes (White et al., 2006), os anfíbios (Kinnear et al., 2007), macrófitas aquáticas (Kinner et al., 2008) e peixes (Gutiérrez-Praena et al., 2012). Por outro lado, Poniedzialek et al. (2014) aferiu que a CYN em concentrações entre 0,01 a 1 µg/mL, podem reduzir a capacidade dos neutrófilos no combate a infeções através de um decréscimo na produção das espécies reativas de oxigénio (ROS).

Muito embora ainda não exista regulamentação em Portugal no que diz respeito a esta cianotoxina, Show (2000) e Falconer (2006) propuseram um valor provisório de 1 µg CYN/L em água para consumo.

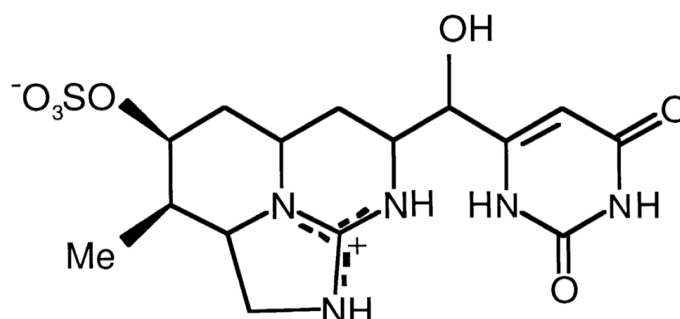


Fig.1.2 – Estrutura molecular da cilindrospermopsina (CYN) (Adaptado de Falconer & Humpage (2005))

1.2.2 Microcistina

As microcistinas (MCs) são as hepatotoxinas de maior dispersão no meio aquático a nível global. As MCs são heptapéptidos monocíclicos com um aminoácido específico, ADDA (ácido 3-amino-9-metóxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienónico) e dois aminoácidos variáveis. A principal diferença entre as várias variantes está nos dois L-amino ácidos na posição 2 e 4 e na desmetilação do ácido D-eritro-β-metil aspártico e/ou N-metildehidroalanina na posição 3 e 7. MCs apresentam um peso molecular entre os 900 e os 1100 Daltons (van Apeldoorn et al., 2007).

De entre todas as variantes de MCs (LA, RR e YR, entre outras), a MC-LR (Fig. 1.2) com os aminoácidos leucina (posição 2) e arginina (posição 4), é a mais frequente e a mais tóxica (Kuiper-Goodman et al., 1999), sendo considerada a MC mais comum a nível mundial, bem como em Portugal (Vasconcelos et al., 1995). A produção da microcistina pela cianobactéria *Microcystis aeruginosa* foi detetada pela primeira vez em águas americanas (Ashworth & Manson, 1946) tendo sido Carmichael et al. (1988) a isola-la pela primeira vez.

Estas cianotoxinas entram nos hepatócitos por polipéptidos transportadores de aniões orgânicos (OATP) que existem em maior abundância nas células do fígado para o transporte de inúmeros compostos orgânicos (Fisher et al., 2005). As MCs atuam ao nível da inibição das fosfatases proteicas serina/treonina sendo que apresentam maior afinidade para as fosfatases 1 e 2A (PP1 e PP2A) (Honkanen et al., 1990; MacKintosh et al., 1990; Toivola & Eriksson, 1999; Guzman et al., 2003). A MC possui também uma atividade promotora de tumores podendo ser cancerígena ao nível do fígado (Dawson 1998; Hitzfeld et al., 2000).

Estudos recentes apontam para que exista uma indução de stress oxidativo ao nível celular em organismos aquáticos, como por exemplo em algas, por MC-LR (Wiegand et al., 2002; Li et al., 2003; Chen et al., 2004; Pflugmacher, 2004; Mohamed, 2008).

É de extrema importância que sejam realizadas monitorizações nos diversos reservatórios de água doce superficial, principalmente as que tem como finalidade o fornecimento de água para consumo humano, visto que mesmo após recolha e passagem por uma estação de tratamento de água (ETA), não é garantida a eficiência no que diz respeito à remoção ou eliminação das MCs. De acordo com o Decreto-Lei n.º 306/2007 do dia 27 de Agosto, “o valor paramétrico para MC-LR é de 1 µg/L em águas de consumo”.

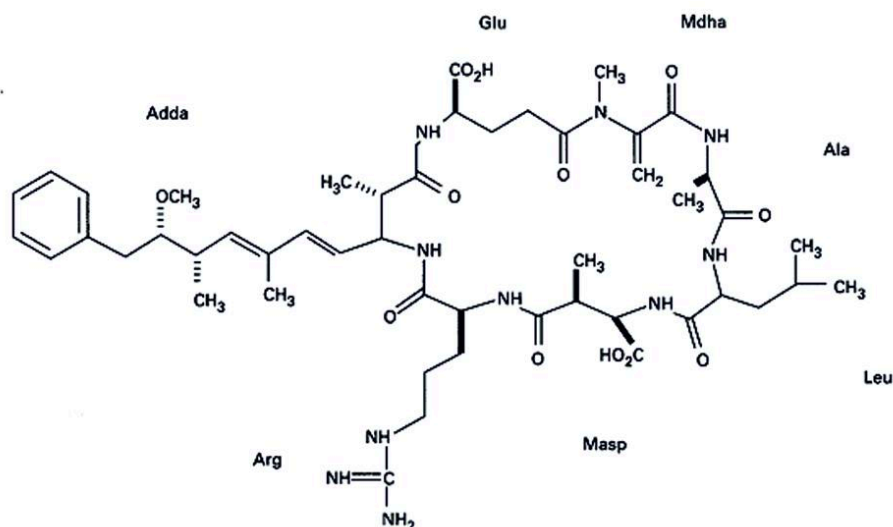


Fig. 1.3 – Estrutura da MC-LR com a posição de cada aminoácido (adaptada de Hitzfeld et al., 2000)

1.3 Toxicidade da cianotoxinas em algas e plantas

1.3.1 Cilindrospermopsina

A cilindrospermopsina tem ao longo do tempo vindo a revelar-se tóxica para várias espécies, entre as quais, bactérias, protozoários, plantas, invertebrados e vertebrados, incluindo humanos.

Pinheiro et al. (2013), expuseram três microalgas, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, e *Nannochloropsis sp.*, a extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo CYN em diferentes concentrações (0,005, 0,025, 0,05, 0,25, 0,5 e 2,5 mg/L). Verificaram que na concentração de 2,5 mg/L após 4 e 7 dias de exposição houve uma inibição da taxa de crescimento de mais de 60 % em *C. reinhardtii* e *C. vulgaris* e 100% de inibição em *Nannochloropsis sp.* Porém, concentrações de CYN inferiores a 2,5 mg/L levaram a um aumento da taxa de crescimento das microalgas após 7 dias de exposição.

Campos et al. (2013), observaram uma redução acentuada no crescimento da *Chlorella vulgaris* após sete dias de exposição ao extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo 32 µg CYN/L, assim como após exposição durante três e sete dias ao

extrato contendo 333 µg CYN/L. Estes resultados sugerem que a toxicidade da *A. ovalisporum* aumenta com a concentração da cianotoxina CYN.

Todos estes efeitos observados podem ser potenciados pela presença de outros metabolitos presentes no extrato bruto.

1.3.2 Microcistina

As MCs são estáveis em reservatórios de água por menos de 1 semana, mas conseguem prevalecer durante um período de tempo superior em água filtrada ou desionizada. Também são resistentes à hidrólise química ou oxidação a pH quase neutro. Vários estudos referiram a capacidade da MC resistir durante várias horas em água em ebulição. A altas temperaturas e a alto ou baixo pH, foi observada uma hidrólise lenta, sendo que para se atingir mais de 90% de hidrólise da molécula necessitou-se de dez semanas a pH 1 e mais de doze semanas a pH 9. As MCs podem ser oxidadas por ozono e outros agentes oxidantes fortes, são estáveis sobre a luz natural, enquanto que a luz ultra-violeta as decompõe (van Apeldoorn et al., 2007).

Como as microalgas estão nos níveis tróficos mais baixos da cadeia alimentar é necessário saber se as MCs prejudicam o seu crescimento e quais as implicações ecológicas destes efeitos.

Em 1998 Sedmak & Kosi expuseram *Coelastrum microporum* (alga verde colonial) a MC-RR pura e demonstraram que pouco tempo depois existia uma estimulação inicial no crescimento seguida de uma inibição. Este resultado pode dever-se à intensidade luminosa, pois na ausência de luz as células não proliferavam não tendo sido observados quaisquer efeitos da MC no fitoplâncton em cultura. Num outro estudo a exposição de *C. reinhardtii* (alga verde unicelular) a extrato bruto de *A. flos-aquae* contendo 10 µg MC/L mostrou existir inibição do crescimento (Kearns & Hunter, 2000).

Dependendo da espécie de microalga selecionada para fazer estudos de toxicidade, diferentes efeitos são observados quando as mesmas são expostas a uma determinada variante química da toxina. Assim, como podem ser observadas respostas diferentes com a mesma espécie, mas usando diferentes variantes de MCs. Esta hipótese foi comprovada por Babica et al. (2007) que, utilizando *C. reinhardtii*, *C. kesslerii*, *Pediastrum duplex*, *Pseudokirchneriella subcapitata* e

Scenedesmus quadricauda na exposição a concentrações superiores a 1000 µg/L, mostrou que a MC-RR conseguia ser mais tóxica nas três primeiras espécies do que a MC-LR, que era mais tóxica em concentrações inferiores.

Campos et al. (2013), apesar de terem verificado um decréscimo no crescimento da *C. vulgaris* após exposição a extrato bruto de *M. aeruginosa* com uma concentração de 41,5 µg MC-LR/L, inicialmente ocorreu uma estimulação de crescimento em 45%.

Em ambientes aquáticos, já vários estudos evidenciaram um decréscimo na abundância e diversidade de várias espécies de macrófitas na presença de florescências de cianobactérias em águas eutrofizadas (Pflugmacher, 2002).

As MCs são conhecidas por afetarem vários processos nos tecidos das plantas, Romanowska-Duda et al. (2002) realizaram um trabalho em que um dos objetivos era demonstrar a influência do extrato bruto cianobacteriano contendo MCs no crescimento da *Spirodela oligorrhiza*. Verificaram que após 24 ou 48h a sua morfologia começava a modificar-se, tendo o extrato inibido o seu crescimento. Já Pflugmacher (2004) expôs a *Ceratophyllum demersum* a extrato cianobacteriano contendo MC-LR com uma concentração de 5,0 µg/L tendo verificado a existência de um aumento das enzimas do sistema antioxidativo (SOD, POD, GPx) evidenciando o stress oxidativo possivelmente provocado pelo extrato.

1.4. Bioacumulação de cianotoxinas

Nos ecossistemas aquáticos ocorre bioacumulação de cianotoxinas em vertebrados e invertebrados aquáticos, incluindo zooplâncton, moluscos, crustáceos e peixes, os quais representam um risco tanto para os animais como para a saúde humana se tais organismos forem consumidos. (Ibelings & Chorus, 2007; Ettoumi et al., 2011)

Um dos problemas atuais diz respeito à capacidade das cianotoxinas entrarem na cadeia alimentar por via agrícola, como por exemplo, através da fonte de água utilizada para a rega das culturas, que pode conter florescências de cianobactérias e cianotoxinas.

1.4.1 Bioacumulação de cilindrospermopsina em algas e plantas

Um dos estudos em que foi detetada a acumulação de CYN em plantas, foi realizado por Prieto et al. (2011) que ao expor plantas de arroz (*Oryza sativa*) a extrato de *A.*

ovalisporum contendo 2,5 µg CYN/L, detetaram CYN nas folhas e raízes, 12,2 µg/g de peso seco e 14,8 µg/g peso seco, respetivamente.

Já Kittler et al. (2012) demonstraram um aumento da concentração de CYN em *Brassica* dependendo da concentração de CYN de exposição.

1.4.2 Bioacumulação de microcistina em algas e plantas

A acumulação de MCs nos organismos aquáticos que são fonte de alimento, é de grande interesse para a saúde pública, pois pode potenciar a exposição humana às toxinas.

No que diz respeito às algas, Mitrovic et al. (2005), verificaram que *Carex fracta* acumulou MC-LR numa taxa de 8 ng g⁻¹ d⁻¹. Já Mohamed (2008) detetou pequenas quantidades de MCs em células de *C. vulgaris* e *S. quadricauda* apenas durante os 3 primeiros dias de exposição e não durante os restantes dias do ensaio, sugerindo que existiu alguma biotransformação da MC nestas algas.

Relativamente a plantas, a planta aquática *Lemna minor* acumulou MC-LR após cinco dias de exposição a 20 µg/L, com uma taxa de acumulação de 58 ng g⁻¹ d⁻¹ (Mitrovic et al., 2005). Em *Phragmites australis* ocorreu uma distribuição de MC-LR em diferentes órgãos após exposição a uma concentração de 0,5 µg/L, detetando-se uma maior absorção no caule e rizoma (Pflugmacher et al., 2001).

Segundo estudos realizados por Crush et al. (2007), Saqrane et al. (2007, 2008) e Bibo et al. (2008), a exposição a MCs inibiu a fotossíntese e a produção de oxigénio, alterou o conteúdo em clorofilas, inibiu a germinação, prejudicou o desenvolvimento da raiz, induziu necrose, reduziu o peso das plantas e inibiu o crescimento da planta. A inibição da fotossíntese e o facto de afetar o desenvolvimento dos tecidos, pode dever-se à inibição das fosfatase 1 e 2A (Yin et al., 2005). Os danos ocorreram a nível celular, nomeadamente no DNA e na inibição proteica, assim como, também, na peroxidação lipídica (LPO), sendo que esta última resulta de reações de oxidação pela ROS.

Os mesmo autores referiram que existe um aumento dos níveis de enzimas antioxidativas (superoxido dismutase, glutathione-s-transferase, glutathione redutase) para a planta conseguir combater o stress oxidativo causado pela exposição à MC.

1.5 Pteridófito *Azolla filiculoides*

A *Azolla* é um pteridófito aquático flutuante, coberto de folhas bilobadas com uma distribuição alternada, com raízes delgadas e ramificadas que emergem do lado ventral do rizoma (Fig. 1.3). O seu nome deriva do grego αἶω (secar) e οἰδνω (matar), tendo sido descrita pela primeira vez por Lamarck em 1783. Este pteridófito pertence à família *Azollaceae*, e neste momento existem 7 espécies (*A. caroliniana*, *A. nilótica*, *A. filiculoides*, *A. pinnata*, *A. mexicana*, *A. microphylla*, *A. rubra*) com distribuição mundial e originárias de climas tropicais a temperados. Ocorrem em águas calmas como rios, barragens, riachos, sendo considerada uma espécie invasora (Pereira & Vasconcelos, 2014). Como possuem a capacidade de se reproduzirem rapidamente quando em condições ambientais ótimas (nutrientes, luz, temperatura, etc), tendem a formar mantos verdes com 5-30 cm de espessura sobre a água, o que pode acarretar consequências, como a incapacidade de sobrevivência de alguns organismos aquáticos (redução da biodiversidade), interferência com mecanismos das ETAs tornando o processo de captação e tratamento mais complicado, redução da superfície aquática para recreio, entupimento de bombas de rega e redução do fluxo de água nos canais de irrigação (Hill & Cilliers, 1999). A *Azolla filiculoides* é segundo o Decreto-Lei n.º 565/99 de 21 de Dezembro, considerada como espécie invasora introduzida em Portugal Continental (Capítulo VII, Disposição Final, do Artigo 26.º do Anexo I).

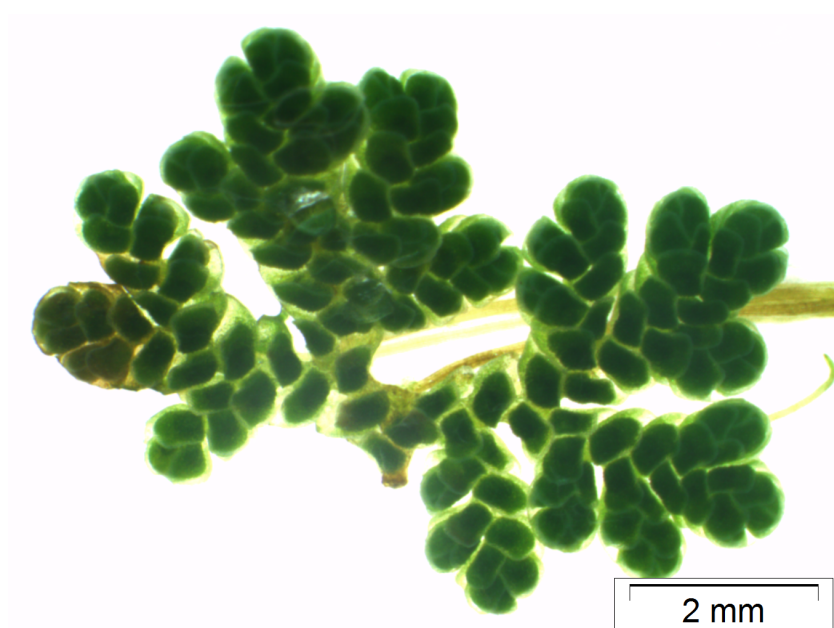


Fig. 1.4 Pteridófito de *A. filiculoides*

Normalmente, os fetos apresentam cor verde, mas em condições de *stress* ambiental, o lobo dorsal clorofilino pode ter uma cor avermelhada devido à presença antocianinas (Shi & Hall, 1998; Braun-Howlan & Nierzwicki-Bauer, 1990). Nos lobos dorsais existe uma cavidade foliar onde reside uma colônia da cianobactéria *Anabaena azollae* e uma comunidade de bactérias. O cianobionte também está presente nos esporocarpos, que após fecundação e desenvolvimento de uma nova planta, inoculam as folhas em desenvolvimento do pteridófito. A reprodução tanto pode ser sexuada, como assexuada com a fragmentação das ramificações laterais dos esporófito levando a uma rápida disseminação do feto (Fig. 1.4). Contudo a reprodução sexuada é mais rara e ocorre maioritariamente em condições de *stress* (Lumpkin & Plucknett, 1980; Carrapiço 2010). A cianobactéria *A. azollae* fixa o azoto e estabelece uma relação de simbiose com o feto.

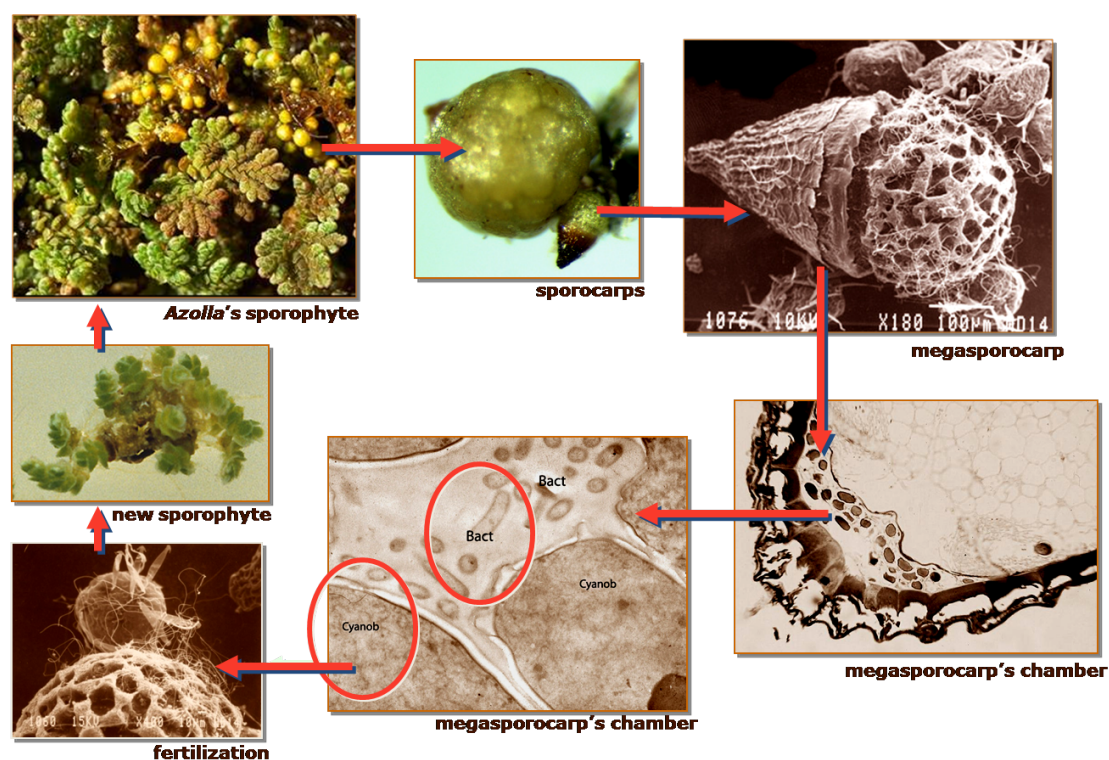


Fig. 1.5 Reprodução sexuada do pteridófito da *A. filiculoides* (<http://theazollafoundation.org/azolla/the-azolla-superorganism/> (carrapiço 2001))

O cianobionte *Anabaena azollae* é uma cianobactéria filamentosa, fixadora de azoto atmosférico que converte o azoto (N_2) em amónia (NH_3) que posteriormente é captado pela *A. filiculoides*.

Esta cianobactéria é constituída por células vegetativas, heterocistos e acinetos. As células vegetativas, têm uma parede celular formada por uma camada de peptidoglicanos e lipossacarídeos e no seu citoplasma carboxissomas, grânulos de poliglucósidos e membranas tilacoidais onde se localizam as ficobiliproteínas e a clorofila *a* (Shi & Hall, 1988). Nos heterocistos, onde se dá a fixação de azoto, existem nódulos polares localizados adjacente às células vegetativas (Hori et al., 2002).

1.6 Microalga *Chlorella vulgaris*

As microalgas são consideradas um grupo vasto de organismos fotossintéticos eucariotas que crescem muito rápido devido à sua estrutura simples (Li et al., 2008) (Fig. 1.6). Aproximadamente, cerca de 40.000 espécies de microalgas já foram descritas (Radmer & Parker, 1993). Segundo Safi et al. (2014) as microalgas podem crescer tanto em ambientes marinhos como dulçaquícolas assim como em condições ambientais diversas desde ambientes gélidos a ambientes quentes. A *C. vulgaris* é uma das mais conhecidas e utilizadas no desenvolvimento de produtos e pertence à família *Chlorellaceae* e ao género *Chlorella*.



Fig. 1.6 Microalga *Chlorella vulgaris*

Esta microalga foi descoberta pela primeira vez por Martinus Willem Beijerinck (1890), o seu nome deriva do grego *chloros* (Χλωρός) que significa verde e o sufixo latino *ella* refere-se ao seu tamanho microscópico. É uma alga unicelular que cresce em água doce (Brasier et al., 2002). Possui uma estrutura esférica com um diâmetro entre 2,5-10 µm (Illman et al., 2000; Yamamoto et al., 2004).

Segundo Safi et al. (2014) a *C. vulgaris* pode crescer em meios autotróficos (águas naturais como lagos e lagoas, águas residuais, lagos artificiais ou reservatórios em

sistema aberto), meios heterotróficos (não é necessária luz e existe uma fonte de carbono orgânico), meios mixotróficos e em imobilização em alginato.

1.7 Fitorremediação de água com *A. filiculoides* e *C. vulgaris*

Ao longo dos anos tem aumentado a preocupação com o ambiente circundante, muito devido ao aumento demográfico e à má gestão dos recursos naturais. Recursos naturais esses, que estão a ser alvo de contaminação sucessiva por via antropogénica. No que diz respeito à água, um recurso limitado e essencial à vida, más práticas estão a ser implementadas, como descargas ilegais de fábricas sem tratamento prévio dos resíduos, más práticas agrícolas e uso excessivo de fertilizantes, tratamentos desempenhados pelas ETARs insuficientes na maioria dos casos, resultando em descargas com quantidades excessivas de fósforo e azoto. Todos estes fatores contribuem para a eutrofização acelerada das massas de água.

Segundo Singh et al. (2003) a fitorremediação trata-se de uma descontaminação de zonas poluídas através de processos biológicos ambientalmente mais sustentáveis pelo uso de plantas que podem possuir a capacidade de acumular ou transformar os contaminantes ambientais ou até mesmo de os remover.

Vários estudos apontam para que a *Azolla* possa ser um adjuvante no tratamento da descontaminação da água. Vafaei et al. (2012) mostraram que a *Azolla filiculoides* remove até 99% do corante C.I. Basic Red 46 utilizado pela indústria têxtil de água contaminada. Já Mashkani et al. (2008) provaram que a *A. filiculoides* pode adsorver céσιο (Cs) e estrôncio (Sr) com elevada taxa de remoção.

Por outro lado, Rakhshaei et al. (2006) sugerem que a biomassa seca de *A. filiculoides* pode remover os metais pesados, Pb^{2+} (chumbo), Cd^{2+} (cádmio), Ni^{2+} (níquel) e Zn^{2+} (zinco).

Quanto à *C. vulgaris* os estudos parecem apontar para que seja uma microalga promissora e com grande potencial para tratamento de águas residuais. O potencial de biorremediação da *C. vulgaris* para água residual têxtil contendo o corante Supranol Red 3BW foi analisado por Lim et al. (2010) que apontaram para uma taxa de remoção entre 41,8 a 50%. Porém Chu et al. (2008) apontaram para que as culturas imobilizadas conseguissem remover até 44% dos corantes enquanto que as culturas em suspensão apenas removiam 34,9%. Relativamente aos teores de azoto e fósforo, Lau et al. (2010) obtiveram uma eficiência de remoção de 76% de azoto e

70% de fósforo pela *C. vulgaris*. Já Aslan & Kapdan (2006) revelaram que a *C. vulgaris* pode remover por completo até 21,2 mg/L da concentração de azoto, tendo no entanto uma baixa tolerância ao fósforo removendo apenas 7,7 mg/L.

1.8 Objetivos

Os objetivos desta investigação foram

- 1) Determinação taxa de *uptake* das cianotoxina por *C. vulgaris* e *A. filiculoides*;
- 2) Determinar a influência de diferentes formulações de meio Z8 em *C. vulgaris*;
- 3) Determinação do conteúdo em carotenóides na *C. vulgaris*;
- 4) Análise do crescimento da *C. vulgaris*;
- 5) Determinação em *A. filiculoides* de parâmetros de crescimento (taxa de crescimento relativo e tempo de duplicação), pigmentos fotossintéticos (clorofilas, carotenóides e ficobiliproteínas) e enzimas antioxidativas (POD, CAT, GPx, GR, GST);
- 6) Determinação da taxa de bioconcentração (BCF) de cilindrospermopsina em *A. filiculoides*;
- 7) Análise dos dados pelo programa estatístico SPSS.

Para que os objetivos fossem atingidos foi necessária a realização de

- 1) Bioensaio em *C. vulgaris* com uma densidade celular de 1×10^5 céls/mL com extrato bruto cianobacteriano contendo cilindrospermopsina e microcistina nas concentrações de 0,055 e 0,150 µg/mL;
- 2) Bioensaio com diferentes concentrações do meio Z8 ($\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, nitrato e fosfato em duplicado e todos os nutrientes duplicados) com *C. vulgaris* exposta a extrato bruto cianobacteriano contendo cilindrospermopsina na concentração de 0,150 µg/mL;
- 3) Bioensaio em *A. filiculoides* com extrato bruto cianobacteriano contendo cilindrospermopsina nas concentrações de 0,05, 0,5 e 5 µg/mL.

2. Materiais e Métodos

2.1 Material biológico

2.1.1 Cultura de *Aphanizomenon ovalisporum*

A cianobactéria *A. ovalisporum* (LEGE-X001) (Fig. 2.1), proveniente da coleção de cultura do LEGE, foi cultivada em meio Z8 (Kotai, 1972) estéril em garrações contendo 15 L de meio. Todo o procedimento da preparação do meio de cultura e inoculação foi realizado em câmara de fluxo laminar em condições estéreis. A cultura cresceu durante 2 meses numa sala aclimatizada, com temperatura de 25°C, um fotoperíodo de 14 h luz/10 h escuridão e com uma intensidade luminosa de 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$. A cultura foi oxigenada através de uma bomba de ar, sendo o ar filtrado através de filtros de 0,2 μm (Pinheiro et al., 2013). Para 1 L de meio Z8 foram adicionados 10 mL de solução A, 10 mL de solução B, 10 mL de Fe-EDTA e 1 mL da solução de micronutrientes (Tabela 2.1). Todas as soluções *stock* foram previamente autoclavadas a 120°C, 1 bar e durante 20 minutos.



Fig. 2.1 Filamento de *A. ovalisporum*

Após dois meses, a cultura foi filtrada com o auxílio de uma rede de plâncton com poro de 20 μm , a biomassa congelada a -80°C, liofilizada (Telstar, Lyoquest, Terrassa, Espanha) e armazenada à temperatura ambiente.

Tabela 2.1 Soluções *stock* para a elaboração do meio Z8.

		Reagente	Quantidade
Meio Z8	Solução A		g/L
		NaNO ₃	46,7
		Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	5,9
		MgSO ₄ .7H ₂ O	2,5
	Solução B	K ₂ HPO ₄	3,1
		Na ₂ CO ₃	2,1
	Solução Fe-EDTA		mL/L
		Solução FeCl ₃ *	10
		Solução EDTA- Na**	9,5
			g/L
		1- NaWO ₄ .2H ₂ O	0,33
		2- (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .2H ₂ O	0,88
		3- KBr	1,2
		4- KI	0,83
		5- ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,87
		6- Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1,55
		7- Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	1,46
		8- CuSO ₄ .5H ₂ O	1,25
		9- NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ .6H ₂ O	1,98
		10- Cr(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0,41
		11- V ₂ O ₅	0,089
		12- Ka(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	9,48
		13- H ₃ BO ₃	3,1
		14- MnSO ₄ .H ₂ O	2,23

*A solução de FeCl₃ foi feita com 100 mL HCl 0,1N e 2,8 g de FeCl₃.6H₂O

** A solução de EDTA-Na foi feita com 100 mL de NaOH 0,1 N e 3,9 g de EDTA-Na₂

*** A solução de micronutrientes foi feita com 10 mL das soluções 1 a 12 e com 100 mL das soluções 13 e 14 para 1L de meio Z8

2.1.2 Cultura de *Chlorella vulgaris*

A microalga *C. vulgaris* (LEGE Z001) proveniente da coleção de cultura do LEGE, foi cultivada em frascos de cultura de 100 mL contendo meio Z8 (ver secção 2.1.1)

numa câmara de cultura com temperatura de 24°C, um fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuridão e com uma intensidade luminosa de 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

2.1.3 Cultura de *Azolla filiculoides*

Os esporófitos de *A. filiculoides* (Fi 1001), proveniente do germoplasma do IRRI (International Rice Research Institute), cresceram em *erlenmeyers* de 1 L contendo o meio Hoagland (H-40) (Tabela 2.2), pH 6,0-6,5, temperatura de 24°C, fotoperíodo 16 h luz/8 h escuridão e intensidade luminosa de 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ fornecida por três lâmpadas *Phillips coolwhite* TLD 36 W (Pereira & Carrapiço, 2009).

Tabela 2.2 Meio cultura de Hoagland (H-40).

Meio H-40		Reagente	Quantidade
	Solução de macronutrientes		mM
		$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,5
		$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,8
		NaCl	0,5
		KH_2PO_4	0,4
		$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	0,05
		KCl	2
	Solução micronutrientes		μM
		$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,3
		$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	9,1
		H_3BO_3	46,3
		$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1
		$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,8
		$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,2
	Solução de Fe-EDTA		μM
		Fe-EDTA Na_2^*	7,2

* A solução de Fe-EDTA Na_2 foi feita com 2 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2,68 g de EDTA- Na_2

2.2 Extração de cilindrospermopsina (CYN) de *A. ovalisporum*

A extração de CYN foi efetuada de acordo com o método utilizado por Welker et al. (2002) e Pinheiro et al. (2013) com ligeiras alterações.

Ao liofilizado colocado num *goblé* foi adicionada água destilada acidificada com ácido trifluoroacético (TFA) (0,1%, v/v) na proporção de 3 g biomassa para 90 mL de solvente de extração e homogeneizado num agitador magnético durante 30 minutos. A lise celular foi induzida por ultrassons (RK100H, Bandelin SonorexTM, Berlim, Alemanha) em banho de água à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Posteriormente, foi realizada uma sonicação com sonda de ultrassons (Vibra-Cell 50, Sonics & Material Inc., Danbury, CT, USA), realizando 5 ciclos de 1 minuto a uma frequência de 20 Hz, mantendo o material biológico em gelo. O conteúdo do *goblé* foi centrifugado (Sorvall RT Legend, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) durante 30 minutos a 4542 xg a uma temperatura de 10°C e o sobrenadante armazenado (extrato bruto) a -20°C.

A extração foi efetuada 5 vezes a partir do *pellet* para que possa ter um maior rendimento de extração de CYN.

2.3 Quantificação de CYN e MC-LR no extrato bruto por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

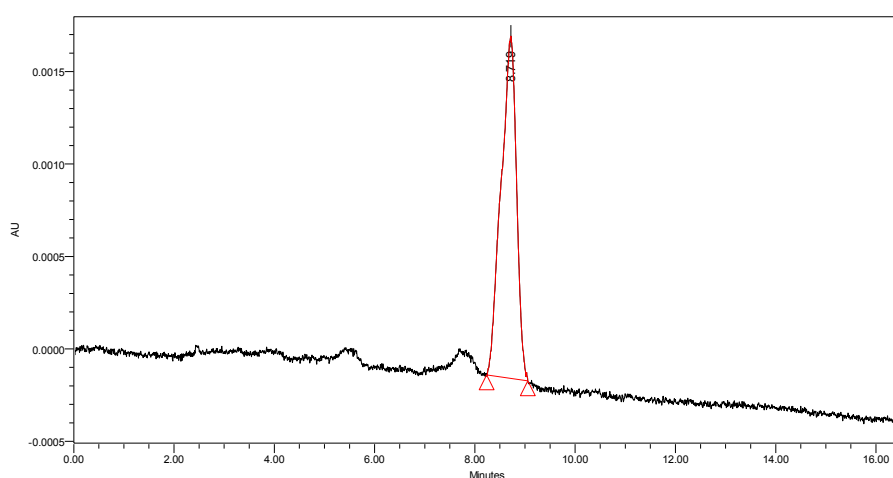
2.3.1 Quantificação de CYN

Um alíquota do extrato bruto de *A. ovalisporum* foi centrifugado por 15 minutos, a 1481 xg, a uma temperatura de 4°C, para limpeza de eventuais agregados celulares que possam interferir com a quantificação da toxina CYN.

A amostra foi quantificada num sistema de HPLC acoplado com um detetor de fotodíodos (Alliance 2695, Waters, Milford, Massachusetts) contendo uma coluna de fase reversa Lichrospher C18 (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm) (Merck, Lisboa, Portugal) mantida a 40°C e utilizando um varrimento entre 210 – 400 nm com um comprimento de onda fixo a 262 nm. A eluição isocrática foi de 5 % de metanol a partir de dois solventes 1) água ultra pura MilliQ acidificada com 0,1 % (v/v) TFA e 2) metanol a 100 % acidificado com 0,1 % (v/v) TFA com um fluxo de 0,9 mL/min e um volume de injeção de 10 µL. O sistema foi calibrado com um padrão de CYN (0,5, 1, 2, 5, 10, 20 e 25 µg/mL) diluído em água ultra pura MilliQ, a partir do qual se

construiu uma reta de calibração $y = 14341x - 237,1$ $R^2=1$. O software Empower 2 Chromatography Data (Waters) foi utilizado para a obtenção da concentração de CYN nas amostras (Fig. 2.2). O limite de detecção (LOD) de CYN em água foi de 0,3 µg/mL baseado numa relação sinal-ruído de 3 ($S/N \geq 3$), sendo que o limite de quantificação (LOQ) é de 0,8 µg/mL baseado numa relação sinal-ruído de 10 ($S/N \geq 10$). Todos os solventes usados no sistema HPLC foram filtrados em filtros de 0,2 µm (Pall GH Polypro 47 mm) e desgaseificado por banho de ultrassons.

A



B

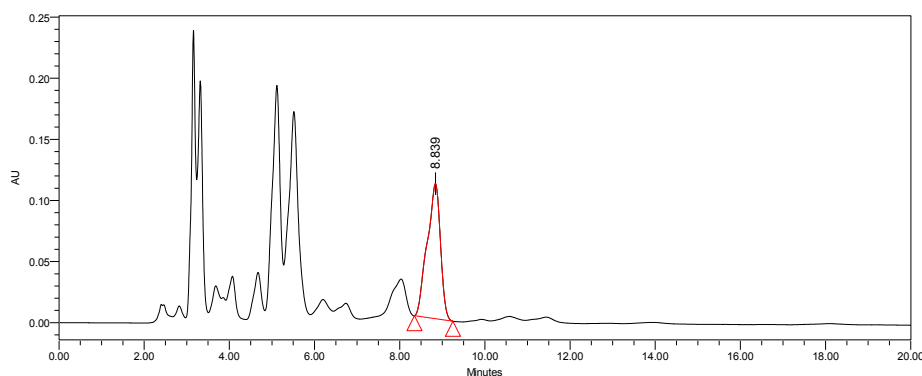


Fig. 2.2 Cromatograma de CYN de um padrão (A) e do extrato bruto de *A. ovalisporum* (B).

2.3.2 Quantificação de MC-LR

O extrato bruto aquoso da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (LEGE 91094) foi gentilmente cedido pela colega Joana Machado, pelo que só se procedeu à sua quantificação.

A quantificação de MC-LR foi baseada nos métodos de Lawton et al. (1994) e Ramanan et al. (2000). A MC-LR foi quantificada no sistema de HPLC acoplado com um detetor de foto-díodos (Alliance 2695, Waters, Milford, Massachusetts), com uma coluna de fase reversa Lichrospher C18 (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm) (Merck, Lisboa, Portugal) e com uma pré-coluna (4 x 4 mm, 5 µm), ambas mantidas a 45°C e um varrimento entre 210 – 400 nm com um comprimento de onda fixo a 238 nm. A eluição linear de gradiente consistiu em 55 % A (metanol 100% + 0,1% TFA) e 45 % B (água ultra pura MilliQ + 0,1% TFA) aos 0 minutos, 65 % A e 35 % B até 5 minutos, 80 % A e 20 % B até 10 minutos, 100 % A até 15 minutos e 55 % A e 45 % B entre 15,1 e 20 minutos, com um fluxo de 0,9 mL/min. O volume de amostra injetado foi de 20 µL. A MC-LR foi identificada por comparação do espectro e tempo de retenção com um padrão de MC-LR (lote nº 018K1209, 10,025 µg/mL em MeOH, 98 % de pureza, Cyano Biotech GmbH, Berlim). O sistema foi calibrado usando 7 concentrações do padrão de MC-LR (0,5 a 20 µg/mL) em metanol 50 % (v/v) a partir do qual se construiu uma reta de calibração $y = 45644x - 11514$, $R^2=0,99745$. O software Empower 2 Chromatography Data (Waters) foi utilizado para a obtenção da concentração de MC-LR nas amostras (Fig. 2.3). O limite de detecção (LOD) de MC-LR em água foi de 0,2 µg/mL baseado numa relação sinal-ruído de 3 ($S/N \geq 3$) sendo que o limite de quantificação (LOQ) é de 0,5 µg/mL baseado numa relação sinal-ruído de 10. Todos os solventes usados no sistema HPLC foram filtrados com filtros de 0,2 µm (Pall GH Polypro 47 mm) e desgaseificado por banho de ultrassons.

2.4 Bioensaios

2.4.1 *Chlorella vulgaris*

2.4.1.1 Exposição ao extrato bruto de CYN e MC-LR

Cada um dos ensaios consistiu nos seguintes grupos: grupo A constituído apenas por meio Z8 e a cianotoxina correspondente; grupo B constituído por meio Z8 e *C. vulgaris* (controlo da cultura); e o grupo C (tratamento) constituído pela microalga, cianotoxina (0,055 e 0,150 µg/mL) e meio Z8. Para cada grupo foram utilizadas 4 réplicas (Fig. 2.4).

Para os ensaios usou-se uma densidade celular de 1×10^5 céls/mL de *C. vulgaris*, tanto para a intoxicação com CYN como para a intoxicação com MC-LR.

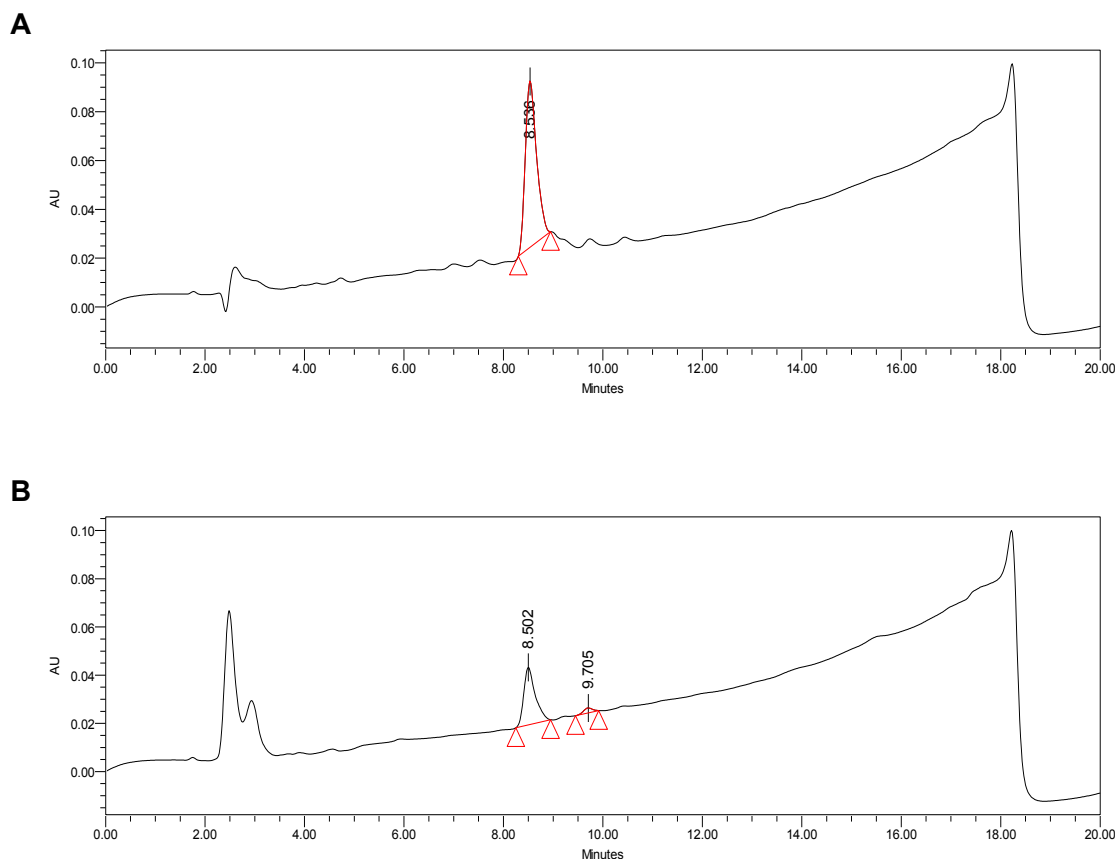


Fig. 2.3 Cromatograma de MC-LR de um padrão (A) e do extrato bruto de *M. aeruginosa* (B).

Os ensaios decorreram em *erlenmeyers* de 100 mL contendo 50 mL de meio Z8 (ver secção 2.1.1), em câmara de cultura com temperatura 25°C, uma intensidade luminosa de 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ e com um fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h escuridão durante 14 dias.

Alíquotas de 200 μL foram retiradas do grupo B e do grupo C nos dias 0, 3, 6, 10 e 14 para se proceder à contagem do número de células na câmara de Neubauer (ver secção 2.5.1.1). No início (tempo zero), ao fim de 7 dias e no fim do ensaio (14 dias) recolheu-se 10 mL dos três grupos para tubos *Falcon*. O meio foi centrifugado durante 30 minutos, a 3456 xg, a 4°C e o sobrenadante foi armazenado a -20°C. Após congelação do sobrenadante, o meio foi liofilizado e o conteúdo recuperado em 400 μL de água ultra pura acidificada com TFA 0,1% no caso da CYN e em metanol 50% no caso da MC-LR, centrifugado a 15000 xg, durante 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação das cianotoxinas (ver secção 2.5.1.2).

O *pellet*, composto pelas células da microalga, foi armazenado a -20°C em microtubos e usado para quantificação de carotenóides (ver secção 2.5.1.3).

O meio de cultura de cada um dos grupos ao 14º dia (final de cada bioensaio) foi centrifugado a 4542 xg à temperatura ambiente durante 30 minutos, o sobrenadante transferido para tubos *Falcons* e armazenado a -20°C para análise de ácidos orgânicos (ver secção 2.5.1.4).

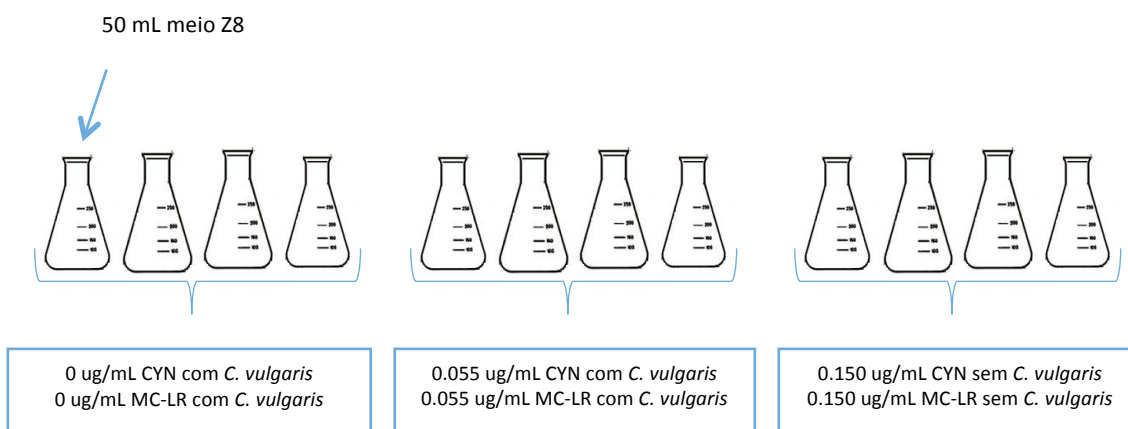


Fig. 2.4 Esquema do procedimento do bioensaio realizado com *C. vulgaris*

2.4.1.2 Exposição a diferentes concentrações de meio Z8

Cada um dos ensaios consistiu nos seguintes grupos: grupo A constituído apenas por meio Z8 modificado e CYN; grupo B constituído por meio Z8 modificado e *C. vulgaris* (controlo da cultura); e o grupo C (tratamento) constituído pela cultura da microalga, CYN (0,150 $\mu\text{g/mL}$) e meio Z8 modificado. Para cada grupo foram utilizadas 4 réplicas (Fig. 2.5).

Para os ensaios usou-se uma densidade celular de 1×10^5 céls/mL de *C. vulgaris*.

No total foram realizados 4 ensaios com o meio Z8 (ver secção 2.1.1) modificado:

- 1) Z8 $\frac{1}{2}$ - todos os nutrientes foram reduzidos a metade (5 mL de solução A, B e Fe-EDTA e 0,5 mL de solução de micronutrientes para 1 L de solução);
- 2) Z8 $\frac{1}{4}$ - todos os nutrientes foram reduzidos para um quarto (2,5 mL de solução A, B e Fe-EDTA e 0,25 mL de solução de micronutrientes para 1 L de solução);
- 3) Z8 N,P 2x - nitrato e fosfato em duplicado (na solução A foi duplicada a quantidade de NaNO_3 que passou a 9,34g e na solução B foi duplicada a quantidade de K_2HPO_4 que passou a 0,62 g). Para 1 L de solução foram

adicionados 10 mL de solução A e B, Fe-EDTA e 1 mL de solução de micronutrientes;

- 4) Z8 2x - todos os nutrientes foram duplicados (20 mL de solução A, B e Fe-EDTA e 2 mL de solução de micronutrientes para 1 L de solução).

Os ensaios decorreram em *erlenmeyers* de 100 mL contendo 50 mL de meio Z8 (ver secção 2.1.1), em câmara de cultura com temperatura 25°C, uma intensidade luminosa de 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ e com um fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h escuridão durante 14 dias.

Alíquotas de 200 μL foram retiradas do grupo B e do grupo C nos dias 0, 3, 6, 10 e 14 para se proceder à contagem do número de células na câmara de Neubauer (ver secção 2.5.1.1).

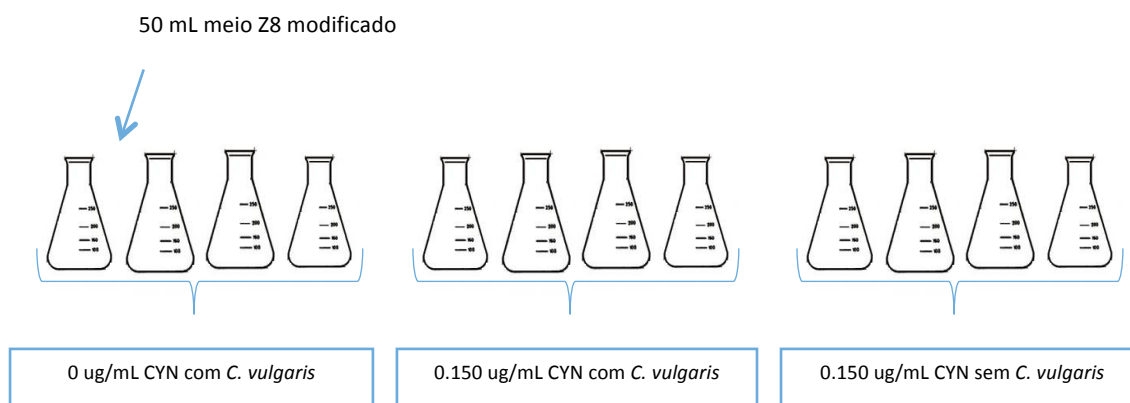


Fig. 2.5 Esquema do procedimento do bioensaio realizado com *C. vulgaris* em meio Z8 modificado.

No início (tempo zero), ao fim de 7 dias e no fim do ensaio (14 dias) recolheu-se 10 mL dos três grupos para tubos *Falcon*. O meio foi centrifugado durante 30 minutos, a 3500 rpm, a 4°C e o sobrenadante foi armazenado a -20°C. Após congelação do sobrenadante, o meio foi liofilizado e o conteúdo recuperado em 400 μL de água ultra pura acidificada com TFA 0,1%, centrifugado a 15000 rpm, durante 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação das cianotoxinas (ver secção 2.5.1.2).

O *pellet*, composto pelas células da microalga, foi armazenado a -20°C em microtubos e usado para quantificação de carotenóides (ver secção 2.5.1.3).

2.4.2 *Azolla filiculoides*

2.4.2.1 Ensaio de fitorremediação

Para a realização deste ensaio utilizou-se 0,25 g de esporófitos de *A. filiculoides* (inóculo inicial) colocada em *erlenmeyers* contendo 50 mL de meio Hoagland (H-40) (ver secção 2.1.3). Neste ensaio foram constituídos 3 grupos tratamento correspondentes a 3 concentrações de extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo a toxina CYN nas concentrações de 0.05, 0.5 e 5 µg/mL. O grupo controlo consistiu na cultura do esporófito de *A. filiculoides* em meio H-40 na ausência da toxina. Tanto os tratamentos como o controlo foram realizados em triplicado.

O ensaio decorreu durante 7 dias em sala de cultura, com temperatura a 24°C, com um fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuridão e com uma intensidade luminosa de 120 µmol/m²s fornecida por três lâmpadas *Phillips coolwhite* TLD 36 W (Pereira & Carrapiço, 2009).

No final do ensaio a biomassa foi lavada em água corrente, seca em papel absorvente, registado o peso fresco e armazenada a -20°C. Igualmente, no final do ensaio, foram recolhidos 10 mL do meio de cultura e armazenado a -20°C. Tanto a biomassa como o meio de cultura foram utilizados para análise de CYN (ver secção 2.5.2.6).

2.4.2.2 Ensaio de toxicidade

Para este ensaio, 1.3 a 1.4 g de esporófitos de *A. filiculoides* foram submetidos a 3 concentrações de extrato bruto de CYN (0.05, 0.5 e 5 µg/mL) durante 7 dias em 400 mL de meio Hoagland (H-40) (ver secção 2.1.3). O grupo controlo consistiu na cultura do esporófito de *A. filiculoides* em meio H-40 na ausência de toxina. Para cada uma das concentrações e controlo foram feitas 3 réplicas.

No fim do ensaio, os pteridófitos foram lavados com água corrente, o excesso de água removido com papel absorvente e armazenado a -80°C. A biomassa foi utilizada para a análise de ficobiliproteínas, clorofilas, carotenóides e enzimas do sistema antioxidativo (ver secção 2.5.2).

2.5 Cálculo de parâmetros

2.5.1 *Chlorella vulgaris*

2.5.1.1 Taxa de crescimento

Aos 200 µL da alíquota recolhida do grupo B (controlo de cultura) e C (tratamento) de ambos os bioensaios foi efetuada uma contagem de células em câmara de Neubauer. A densidade celular foi calculada pela fórmula

$$N^{\circ}\text{Células/mL} = \text{média total do } n^{\circ} \text{ de células} \times 25 \text{ quadrículas} \times [10]^{-4}$$

Após o cálculo da densidade celular procedeu-se ao cálculo da taxa de crescimento parcial (Pinheiro et al., 2013) para todas as réplicas, todos os tempos (0, 3, 6, 10 e 14 dias) e para ambos os ensaios pela fórmula

$$\mu_{j-i} \text{ (dia}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Ln}(A_j) - \text{Ln}(A_i)}{T_j - T_i}$$

onde *i* e *j* representam os dias de contagem, A representa a densidade celular em cada dia e o T representa o tempo de cada contagem.

2.5.1.2 Quantificação de CYN e MC-LR do meio de cultura por HPLC

O meio de cultura liofilizado e ressuspenso foi utilizado para análise de CYN (ver secção 2.3.1) e MC-LR (ver secção 2.3.2) em HPLC.

2.5.1.3 Extração e quantificação de carotenóides

A extração e quantificação de carotenóides foi feita com base nos métodos utilizados por Lichtenthaler (1987) e Lichtenthaler & Buschmann (2001), com algumas modificações.

A biomassa de *C. vulgaris* anteriormente armazenada em microtubos e guardada a -20°C, foi centrifugada a 3000 g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram revestidos com papel de alumínio para evitar a oxidação dos carotenóides. Ao *pellet* foi adicionado 500 µL de metanol a 100%, seguido de agitação durante 5 minutos, e centrifugação a 3000 g, durante 5 minutos. O sobrenadante foi retirado para um novo microtubo. Ao *pellet* foi feita nova extração e o sobrenadante adicionado ao sobrenadante da primeira extração.

Do sobrenadante resultante das duas extrações retirou-se 200 µL para uma placa de 96 poços para medição da absorvância nos comprimentos de onda 470, 652 e 665 nm no espectrofotómetro Synergy HT (Biotek Instruments, Winooski VT, EUA) equipado com um *software* Gen5 2.00. Todas as amostras foram medidas em duplicado.

O conteúdo em carotenóides (Car_{x+c}) foi calculado segundo a equação

$$Car_{x+c}(\mu g/g PF) = \left(\frac{(1000 \times Abs_{470} - 1,63 \times Cl_a - 104,96 \times Cl_b)}{221} \right) \times V / PF$$

em que Cl_a representa a clorofila a calculada segundo a fórmula

$$Cl_a (\mu g/mL) = 16,72 \times Abs_{665} - 9,16 \times Abs_{652}$$

Cl_b representa a clorofila b calculada pela seguinte formula

$$Cl_b (\mu g/mL) = 34,09 \times Abs_{652} - 15,28 \times Abs_{665}$$

V é o volume do solvente de extração e PF o peso fresco de *C. vulgaris*.

2.5.1.4 Quantificação de ácidos orgânicos

A análise dos ácidos orgânicos no meio de cultura do bioensaio com duas cianotoxinas (CYN e MC-LR) em duas concentrações (0,055 e 0,150 µg/mL) foi feita de acordo com Rocha et al. (2013).

A purificação e a pré-concentração dos ácidos orgânicos das amostras foi realizada recorrendo ao método de extração em fase sólida (SPE) com colunas Oasis Max (6 cc/150 mg, 30 μ m) (Waters Oasis, Lisboa, Portugal) em vácuo (Visiprep™ 24, Supelco). As colunas SPE foram pré-condicionadas com 6 mL de metanol 100% seguindo-se 6 mL de água ultra pura MilliQ a pH 9 (ajustado com 1 M NaOH). Após os padrões e as amostras (ajustado a pH 9 com 1 M NaOH) terem sido eluídos através da coluna, esta foi lavada com água ultra pura MilliQ a pH 9 (ajustado com 1 M NaOH). Os ácidos orgânicos foram eluídos com 6 mL de uma solução de H₂SO₄ a 8,5 mM em metanol 100%. O eluído foi evaporado no SeepVac (Labconco, Kansas City, MO, EUA) a 30°C. O resíduo resultante da evaporação foi dissolvido em 1 mL de uma solução aquosa de H₂SO₄ a 8,5 mM em metanol 100%.

Antes da análise por HPLC, todas as amostras e padrões foram acidificadas para pH < 3 com uma solução de H₂SO₄ a 1,8 M, para que a solução injetada tenha uma concentração de H₂SO₄ semelhante ao da fase móvel.

Os ácidos orgânicos presentes nas amostras foram determinados num sistema HPLC Beckman Coulter Gold HPLC (Barcelona, Espanha) equipado com um detetor de díodos 168, um coletor de amostras automático 508 e uma coluna Rezex ROA-ácidos orgânicos H⁺ (300 x 7,80 mm, 8 μ m) (Phenomenex, Lisboa, Portugal).

A fase móvel (solução aquosa de H₂SO₄ a 8,5 mM) foi previamente filtrada através de um filtro de nitrocelulose com uma porosidade de 0,45 μ m e desgaseificado num banho de ultrassons por 30 minutos. A coluna operou à temperatura ambiente com uma taxa de fluxo de 0,36 mL/min e cada corrida demorou 30 minutos. O volume da injeção foi de 50 μ L. Todos os dados foram processados com o *software* Karat™ (Beckman Coulter) com detetor de díodos (DAD) com uma gama entre os 190 a 600 nm, sendo os ácidos orgânicos detetados a 210 nm. A calibração foi feita através de seis soluções padrão com diferentes concentrações de ácidos orgânicos (2, 4, 6, 8 e 10 mg/L). Após a injeção de todos os padrões dissolvidos em meio Z8 obteve-se as retas de calibração:

- 1) Ácido maleico $y = 47740x + 16164$, $R^2=0,997$
- 2) Ácido málico $y = 17300x - 3097,3$, $R^2= 0,997$
- 3) Ácido succínico $y = 45713x + 14705$, $R^2= 0,998$

2.5.2 *Azolla filiculoides*

2.5.2.1 Taxa de crescimento relativo

A taxa de crescimento relativo (TCR) foi calculada para os tratamentos e controlo (Pereira & Carrapiço, 2009) de acordo com a seguinte fórmula

$$TCR \text{ (dia}^{-1}\text{)} = \frac{\ln(P1) - \ln(P0)}{T}$$

em que P0 e P1 corresponde ao peso fresco inicial e final da biomassa, e T corresponde ao intervalo de tempo entre as duas pesagens.

2.5.2.2 Extração e quantificação da clorofila e carotenóides

A extração de clorofilas e carotenóides foi feita de acordo com o método utilizado por Lichtenthaler (1987).

Cerca de 100 mg de *A. filiculoides* por cada tratamento e controlo foi seccionado com bisturi e colocada em tubos de *Falcon*, revestidos a papel de alumino para evitar a degradação dos carotenóides, contendo 1 mL de etanol a 96 % e extraído durante a noite a 4°C. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 4°C durante 20 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante recolhido para microtubos e armazenados a -20°C.

A leitura de absorvância das amostras foi feita numa placa de 96 poços em duplicado com 200 µL de cada uma das amostras. A absorvância foi medida para os comprimentos de onda 470, 648, 664 e 750 nm num espectrofotómetro Synergy HT equipado com o *software* Gen5 2.00.

A obtenção do conteúdo de clorofila *a* (Cl_a), clorofila *b* (Cl_b), carotenoides (C_{x+c}), clorofila total, rácio clorofila *a/b* e rácio clorofila total/carotenóides foi feita com base nas seguintes equações

$$Cl_a \text{ (mg /g PF)} = \frac{(13,36 \times Abs_{664} - 5,19 \times Abs_{648}) \times V}{PF}$$

$$Cl_b \text{ (mg /g PF)} = \frac{(27,43 \times Abs_{648} - 8,12 \times Abs_{664}) \times V}{PF}$$

$$\text{Total Cl (mg/g PF)} = Cl_a + Cl_b$$

$$C_{x+c} \text{ (mg /gPF)} = \frac{(4,785 \times Abs_{470} + 3,657 \times Abs_{664} - 12,76 \times Abs_{648}) \times V}{PF}$$

$$\text{Rácio } a/b = \frac{Cl_a}{Cl_b}$$

$$\text{Rácio Total Cl}/C_{x+c} = \frac{\text{Total Cl}}{C_{x+c}}$$

em que V representa o volume de solvente de extração e PF representa o peso fresco do pteridófito *A. filiculoides*.

2.5.2.3 Extração e quantificação de ficobiliproteínas

A extração de ficobiliproteínas foi realizada de acordo com Kaplan et al. (1986) com ligeiras alterações. Para o efeito foram macerados 100 mg de biomassa de pteridófitos de cada grupo experimental com azoto líquido. Ao macerado adicionou-se 500 µL de tampão fosfato de sódio a 2,5 mM a pH 7, em gelo, homogeneizada por agitação e extraída durante a noite a 4°C. Após o período de extração, o extrato foi centrifugado durante 15 minutos a 4542 xg, 4°C. O sobrenadante foi colocado em microtubos e armazenado a -20°C.

A leitura da absorvância numa placa de 96 poços, foi efectuada no espectrofotómetro Synergy HT equipado com um *software* Gen5 2.00, nos comprimentos de onda de 572, 612, 647 e 750 nm.

Os cálculos para estimar o conteúdo de ficoeritrocianina (PEC), ficocianina (PC), aloficocianina (APC) e total de ficobiliproteínas (PBP) foi feito de acordo com as seguintes equações

$$PEC \text{ (mg/g PF)} = (((Abs_{572} - 0,619 \times Abs_{612} + 0,088 \times Abs_{647}) / 5,775) \times V) / PF$$

$$PC \text{ (mg/g PF)} = (((1,165 \times Abs_{612} - 0,727 \times Abs_{647} - 0,332 \times Abs_{572}) / 5,483) \times V) / PF$$

$$APC \text{ (mg /g PF)} = (((0,049 \times Abs_{572} - 0,205 \times Abs_{612} + Abs_{647}) / 4,001) \times V) / PF$$

$$PBP \text{ (mg/g PF)} = PEC + PC + APC$$

em que V representa o volume de solvente de extração e PF representa o peso fresco do pteridófito *A. filiculoides*.

2.5.2.4 Extração e quantificação de proteínas

Para a extração das proteínas de acordo com o método utilizado por Azooz et al. (2009) e Yin et al. (2005), 500 mg de biomassa de *A. filiculoides* foram maceradas em azoto líquido. As proteínas foram solubilizadas adicionando a cada amostra 5 mL de tampão fosfato de sódio a 100 mM, pH 7, com agitação, seguindo-se 15 minutos de incubação em gelo, centrifugação durante 30 minutos a 4542 xg a 4°C, sendo o sobrenadante transferido para microtubos e armazenados a -80°C.

A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford (Bradford, 1976), seguindo as especificações do *kit* de quantificação comercial (Biorad, Porto, Portugal).

À placa de 96 poços foi adicionado 250 µL de reagente de Bradford e 5 µL de amostra ou do padrão albumina sérica bovina (nas concentrações de 0,25, 0,5, 1 e 1,4 mg/mL). A placa foi agitada durante 30 segundos e incubada durante 45 minutos à temperatura ambiente. A absorvância a 595 nm foi medida num espectrofotómetro Synergy HT equipado com um *software* Gen5 2.00. A concentração de proteína nas amostras foi determinada pela reta padrão $y = 0,3341x - 0,0368$, $R^2 = 0,97554$.

2.5.2.5 Determinação da atividade de enzimas antioxidativas

2.5.2.5.1 Catalase

A catalase decompõe o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em água e oxigénio molecular (O_2), sendo por isso considerada uma enzima do sistema antioxidativo muito importante.

A sua atividade foi determinada pelo método do molibdato de amónia (Góth, 1991) modificado para microplaca de 96 poços. A cada poço foram adicionados 27 μ L de amostra em 136 μ L de H_2O_2 a 65 mM em tampão fosfato de sódio a 60 mM, pH 7,4 e incubado durante 1 minuto a 37°C. Após este período de tempo, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 136 μ L de molibdato de amónia a 32,4 mM, formando-se um complexo amarelo de molibdato de amónia e peróxido de hidrogénio. Foram incluídos 3 brancos de acordo com a tabela 2.3.

A leitura das absorvâncias em duplicado foi feita a 405 nm num espectrofotómetro Synergy HT equipado com o *software* Gen5 2.00.

Tabela 2.3 Reagentes adicionados para os brancos para a determinação da CAT.

Branco 1	Branco 2	Branco 3
136 μ L H_2O_2	136 μ L H_2O_2	136 μ L tampão fosfato de sódio
136 μ L molibdato de amónia	136 μ L molibdato de amónia	136 μ L molibdato de amónia
27 μ L amostra	27 μ L tampão fosfato de sódio	27 μ L tampão fosfato de sódio

O cálculo da atividade foi feito com base na seguinte equação

$$CAT \text{ (kU /mg Prot)} = \frac{\left(\frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco 1}}{Abs_{branco 2} - Abs_{branco 3}} \right) \times 271}{Conc. Prot.}$$

2.5.2.5.2 Peroxidase

A taxa de decomposição do H_2O_2 pela peroxidase utilizando o guaiacol como dador de hidrogénio é determinada pela medição do produto oxidado, o tetraguaiacol (Bergmeyer, 1974).

A atividade da peroxidase (POD) foi determinada de acordo com o método de Fu & Huang (2001) com algumas modificações. Em cada poço foi adicionado tampão fosfato de sódio a 100 mM com pH 7, amostra, guaiacol a 20 mM e H_2O_2 a 40 mM, de acordo com a tabela 2.4.

A leitura da absorvância foi feita em duplicado, no comprimento de onda de 470 nm num espectrofotómetro Synergy HT equipado com o *software* Gen5 2.00.

Tabela 2.4 Reagentes adicionados ao branco e à amostra para determinação da POD.

	Branco	Amostra
Tampão fosfato (μL)	196,7	190
Guaiacol (μL)	3,4	3,4
H_2O_2 (μL)	1,3	1,3
Amostra (μL)	-	6,7

A atividade da POD foi calculada de acordo com a seguinte equação (Zeraik et al., 2008)

$$\text{Atividade POD (U /mg Prot)} = \frac{\left(\frac{\text{Abs 470/min}}{E} \right) \times \left(\frac{1}{V} \right)}{\text{Conc. Prot.}} \times 1000$$

onde E corresponde à absortividade molar do tetraguaiacol (26,6 L/mol/cm) e V corresponde ao volume da amostra.

2.5.2.5.3 Glutathiona redutase

A glutathiona redutase (GR) catalisa a redução de glutathiona disulfido oxidada (GSSG) a glutathiona reduzida (GSH) com a oxidação simultânea de NADPH para

NADP⁺. A atividade da GR é medida monitorizando o decréscimo nos níveis de NADPH a 340 nm.

A atividade da GR foi determinada de acordo com o método de Carlberg e Mannervik (1975) adaptado para microplaca (Lima et al., 2007). Em cada poço foi adicionado tampão fosfato de sódio a 100 mM com pH 7, amostra e GSSG a 5 mM de acordo com a tabela 2.5. A placa foi incubada durante 10 minutos e a reação foi iniciada adicionando a cada poço 30 µL de NADPH. A absorvância foi medida a 340 nm a cada 10 segundos durante 5 minutos, à temperatura de 25°C, num espectrofotómetro Synergy HT equipado com o *software* Gen5 2.00.

Tabela 2.5 Reagentes adicionados ao branco e à amostra para determinação da GR.

	Branco	Amostra
Tampão fosfato 0,1 M (µL)	240	190
GSSG (µL)	30	30
Amostra (µL)	-	50

A atividade da GR foi determinada pela seguinte equação

$$\text{GR (mol/min)/(mg prot)} = \frac{1}{(6,2 \times 0,81) \times \left(\frac{VA}{VT}\right)} \times \frac{\text{DO/min}}{\text{Conc. Prot.}}$$

onde DO/min é a densidade óptica por minuto, 6,2 é o coeficiente de extinção do NADPH (mM/cm), 0,81 é a profundidade do poço que será atravessado pela luz (cm), VA corresponde ao volume da amostra colocado em cada poço para o ensaio enzimático e VT corresponde ao volume total colocado em cada poço.

2.5.2.5.4 Glutathione-S-transferase

A glutathione-S-transferase (GST) abrange uma família de enzimas multifuncionais que tem um papel crucial na destoxificação e tolerância ao *stress* oxidativo.

A determinação da sua atividade foi feita segundo o método de Habig et al. (1974) adaptado para microplaca de 96 poços (Lima et al., 2007), em que um produto (tio-

ester) é formado pela conjugação do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathiona reduzida (GSH).

A solução de reação foi feita com 300 µL de CDNB a 60 mM, 1800 µL de glutathiona reduzida (GSH) a 10 mM e 9900 µL de tampão fosfato a 100 mM a pH 6,5. A cada poço foi adicionado a solução de reação e água ultra pura ou amostra de acordo com a tabela 2.6.

A leitura da absorvância foi feita no comprimento de onda de 340 nm em ensaio cinético com 16 leituras de 20 em 20 segundos num espectrofotómetro Synergy HT equipado com *software* Gen5 2.00 à temperatura de 25°C.

Tabela 2.6 Reagentes adicionados ao branco e à amostra para determinação da GSH.

	Branco	Amostra
Água ultra pura (µL)	100	-
Amostra (µL)	-	100
Solução de reação (µL)	200	200

A atividade da GST foi determinada pela equação

$$\text{GST (nmol /min)/mg Prot)} = \frac{\frac{\text{DO}}{\text{min}} \times \text{Diluição amostra} \times \text{Vol. do poço} \times 1000}{9,6 \times \text{Vol. amostra} \times \text{Conc. prot} \times 0,9}$$

em que DO representa a densidade ótica por minuto.

2.5.2.5.5 Glutathiona peroxidase (GPx)

A glutathiona peroxidase (GPx) pertence a um grupo importante de enzimas que protegem as células contra danos causados por ROS. A GPx catalisa a redução do H₂O₂ ou hidroperóxidos orgânicos, produzindo-se água ou álcoois pela glutathiona reduzida.

A atividade da GPx foi determinada de acordo com o método de Flohé & Günzler (1984) adaptado a microplaca de 96 poços (Lima et al., 2007). A solução de reação foi feita com 124 µL de tampão fosfato 100 mM pH 6,5, 20 µL GSH, 20 µL de NADPH 1mM e 1,6 µL de GR 30 U/mL. A cada poço foi adicionado a solução de

reação, a amostra ou tampão fosfato ou H_2O_2 6 mM de acordo com a tabela 2.7. A leitura da absorvância foi feita no comprimento de onda de 340 nm em ensaio cinético com 16 leituras de 20 em 20 segundos num espectrofotómetro Synergy HT equipado com o *software* Gen5 2.00 à temperatura de 25°C.

Tabela 2.7 Reagentes adicionados ao branco e à amostra para determinação da GPx.

	Branco	Amostra
Tampão fosfato (µL)	34,4	-
Amostra (µL)	-	14,4
Solução de reação (µL)	165,6	165,6
H_2O_2 (µL)	-	20

A atividade da glutathione peroxidase foi obtida pela seguinte equação (Flohé & Günzler 1984)

$$\text{GPx (nmol/min)/mg Prot)} = \frac{\frac{\text{DO}}{\text{min}} \times \text{Volume poço}}{6,22 \times \text{Vol. amostra}(\mu\text{L}) \times \text{Conc. prot} \times 0,9}$$

onde DO/min representa a densidade óptica por minuto.

2.5.2.6 Quantificação da CYN no meio de cultura H-40 e em *A. filiculoides*

A biomassa do ensaio de fitorremediação de *A. filiculoides* do tratamento e do controlo foi macerada em azoto líquido e procedeu-se à extração de CYN com água ultra pura acidificada com TFA 0,1% (ver secção 2.2).

O meio de cultura foi liofilizado e ressuspenso em água ultra pura MilliQ acidificada com TFA 0,1%.

A CYN presente nos esporófitos de *A. filiculoides* no meio de cultura H-40 foi quantificada de acordo com o método descrito na secção 2.3.1.

O fator de bioconcentração (FBC) foi calculado utilizando a seguinte equação (Karjalainen et al., 2003)

$$FBC = [MC-LR]_{A. \text{ filiculoides}} / [MC-LR]_{\text{meio}}$$

2.6. Análise estatística

Os dados de *C. vulgaris* e *A. filiculoides* foram analisados para normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e para a homogeneidade de variâncias pelo teste Levene, ambos com $P > 0,05$. Os dados não normais foram transformados e novamente efectuado o teste Shapiro-Wilk. Foi feita uma análise One-Way ANOVA no caso da *A. filiculoides* e Two-Way ANOVA no caso da *C. vulgaris*. As diferenças nos valores das médias entre grupos no caso da *A. filiculoides* foram avaliadas pelo teste Tukey. Quando os dados não eram normais ou homogêneos utilizou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e os pares de médias foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. O nível de significância (α) foi de 0,05 e considerados estatisticamente significativos a um $P < 0,05$ (Zar, 1999). Todos os testes foram feitos no programa “Statistical Package for Social Science” (IMB SPSS Statistics versão 22).

3. Resultados

3.1 *Azolla filiculoides*

3.1.1 Taxa de crescimento

No ensaio com extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo CYN (Fig. 3.1), a *A. filiculoides* apresentou um aumento na taxa de crescimento relativo na concentração de 0,5 μg CYN/mL ($0,0968 \text{ g g}^{-1} \text{ dias}^{-1}$), e um decréscimo na taxa de crescimento na concentração de 5 μg CYN/mL ($0,0001 \text{ g g}^{-1} \text{ dias}^{-1}$). Diferenças estatisticamente significativas (teste Tukey, $P < 0,05$) foram detetadas na taxa de crescimento da *A. filiculoides* na concentração de 5 μg CYN/mL em comparação com as restantes concentrações (0,05 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$) e o controlo.

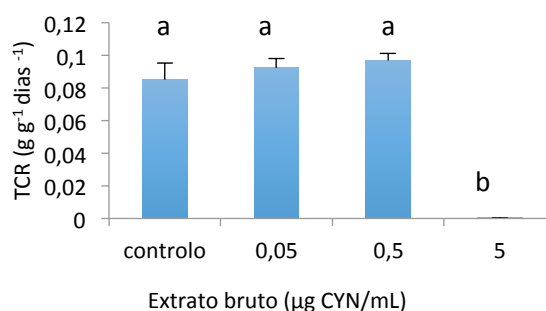


Fig. 3.1 Taxa de crescimento relativo (TCR) da *A. filiculoides* após 7 dias de exposição a um extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo CYN. As barras representam a média \pm SE ($n=3$). Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas.

3.1.2 Clorofilas e carotenóides

Em relação à clorofila *a*, o valor mais alto foi obtido na concentração de 5 μg CYN/mL ($162,0915 \text{ mg/g PF}$). As diferenças estatisticamente significativas (teste Tukey, $P < 0,05$) ocorreram entre a concentração de 5 μg CYN/mL e as restantes concentrações (0,05 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$) incluindo o controlo (Fig. 3.2 A).

Tal como na clorofila *a*, o valor mais alto de clorofila *b*, manifestou-se na concentração de 5 µg CYN/mL (57,9514 mg/g PF) e as diferenças estatisticamente significativas (teste Tukey, $P < 0,05$) entre a concentração de 5 µg CYN/mL e todas as restantes concentrações (0,05 e 0,5 µg/mL) e controlo (Fig. 3.2 B).

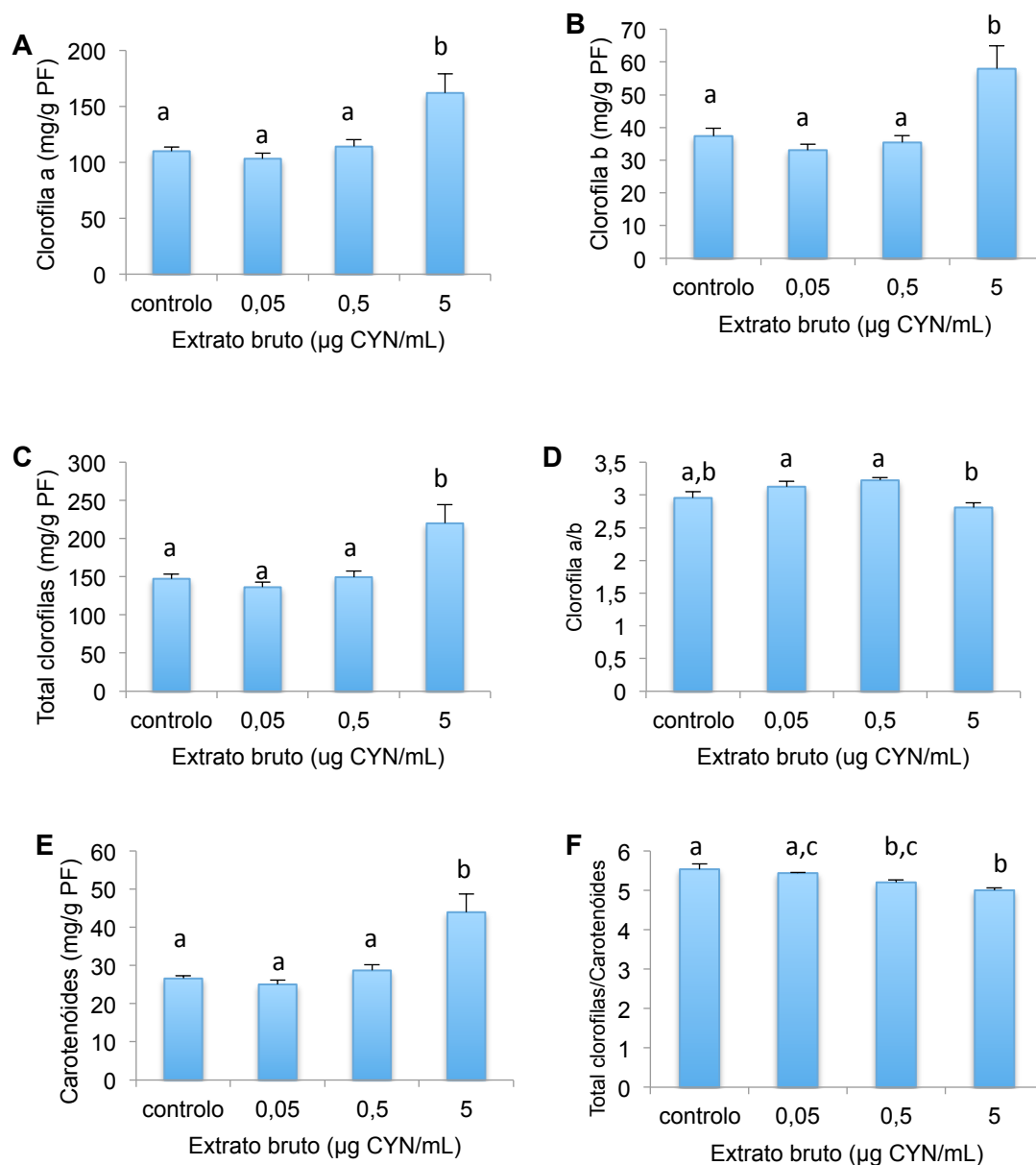


Fig. 3.2 Clorofilas e carotenóides de *A. filiculoides* após 7 dias de exposição a diferentes concentrações de extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo CYN. A-clorofila *a*; B-clorofila *b*; C-Total clorofilas; D-Clorofila *a/b*; E-Carotenóides; F-Total de clorofilas/Carotenóides. As barras representam média \pm SE ($n=3$). Letras diferentes referem-se a diferenças estatísticas significativas.

Na análise para o total de clorofilas, verificou-se mais uma vez que na concentração de 5 µg CYN/mL foi onde se obteve uma maior quantidade de clorofilas (220,04 mg/g PF). As diferenças estatisticamente significativas (teste de Tukey, $P < 0,05$) verificaram-se entre a concentração de 5 µg CYN/mL e as restantes concentrações e o controlo (Fig. 3.2 C).

Relativamente ao rácio clorofila *a/b*, o valor mais elevado foi obtido na concentração de 0,5 µg CYN/mL (3,23 mg/g PF). As diferenças estatisticamente significativas (teste Tukey, $P < 0,05$) foram detetadas entre a concentração de 5 µg CYN/mL e as concentrações de 0,05 e 0,5 µg CYN/mL, não existindo qualquer tipo de diferença entre o controlo e todas as concentrações (Fig. 3.2 D).

Quanto aos carotenóides foi obtida uma maior quantidade na concentração de 5 µg CYN/mL (43,97 mg/g PF), existindo uma diferença estatística (teste Mann-Whitney, $P < 0,05$) entre essa concentração e as restantes, incluindo o controlo (Fig. 3.2 E).

O rácio total clorofilas/carotenóides é superior no controlo (5,54) quando comparado com o valor das restantes concentrações. As diferenças estatisticamente significativas (teste Tukey, $P < 0,05$) foram detetadas entre o controlo e as concentrações de 0,5 e 5 µg CYN/mL e ainda entre a concentração de 0,05 e 5 µg CYN/mL (Fig. 3.2 F).

3.1.3 Ficobiliproteínas

Nas ficocianinas (PC) o valor mais elevado foi encontrado na concentração de 0,5 µg CYN/mL (0,017 mg/g PF). Mas, não existiram diferenças estatisticamente significativas (teste Kruskal-Wallis, $P > 0,05$) (Fig. 3.3 A).

Nas aloficocianinas (APC) o valor mais elevado foi obtido na concentração de 0,5 µg CYN/mL (0,021 mg/g PF) e não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas (teste Kruskal-Wallis, $P > 0,05$) (Fig. 3.3 B).

Na ficoeritrocianina (PEC), o valor mais alto foi encontrado na concentração de 5 µg CYN/mL (0,013 mg/g PF), não tendo ocorrido diferenças estatisticamente significativas (teste Kruskal-Wallis, $P > 0,05$) (Fig. 3.3 C).

O valor mais elevado do total de ficobiliproteínas foi obtido na concentração de 0,5 µg CYN/mL (0,045 mg/g PF). Porém, não existiram diferenças significativas entre as concentrações incluindo o controlo (teste Kruskal-Wallis, $P > 0,05$) (Fig. 3.3 D).

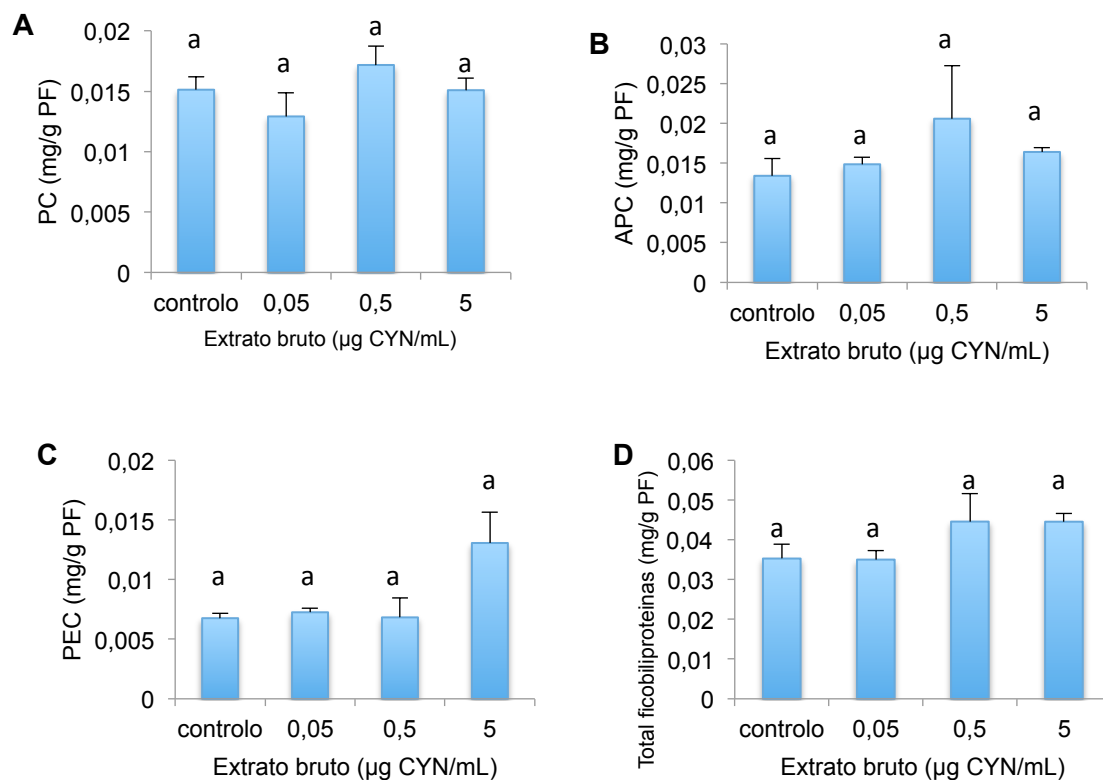


Fig. 3.3 Conteúdo em ficobiliproteínas em *A. azollae* após 7 dias de exposição a diferentes concentrações do extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo CYN. A-Ficocianina (PC); B-Aloficocianina (APC); C-Ficoeritrocianina (PEC); D-Total ficobiliproteínas. As barras representam média \pm SE (n=3). Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas.

3.1.4 Quantificação de proteínas

A maior quantidade de proteína foi encontrada na concentração de 5 µg CYN/mL (1,66 mg/g PF) e as diferenças estatisticamente significativas (teste Tukey, $P < 0,05$) foram detetadas entre a concentração de 5 µg CYN/mL e todas as restantes, incluindo o controlo (Fig. 3.4)

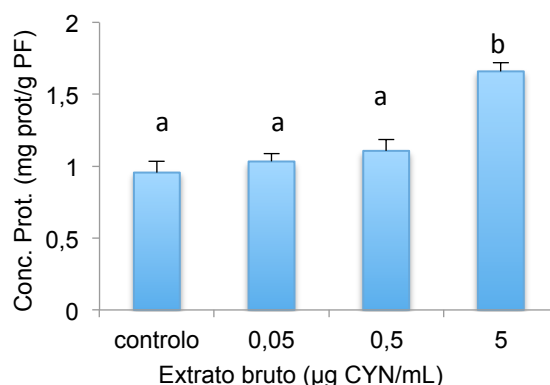


Fig. 3.4 Concentração de proteína em *A. filiculoides* após 7 dias de exposição a extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo CYN. As barras representam média \pm SE (n=3). Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas.

3.1.5 Determinação da atividade das enzimas do sistema antioxidativo

O extrato proteico foi analisado para a atividade de cinco enzimas do sistema antioxidativo, nomeadamente: catalase (CAT), peroxidase (POD), glutathiona redutase (GR), glutathiona-S-transferase (GST) e glutathiona peroxidase (GPx).

A atividade da catalase (Fig. 3.5 A) foi superior na concentração de 0,05 µg CYN/mL (0,176 kU/mg prot) e inferior na concentração de 5 µg CYN/mL (0,077 kU/mg prot). Mas, não existiram diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, $P > 0,05$).

Na atividade da peroxidase obtiveram-se os valores mais elevados no controlo (101,36 U/mg prot) e os valores mais reduzidos na concentração de 0,5 µg CYN/mL (33,90 U/mg prot) (Fig. 3.5 B), mas as diferenças não foram estatisticamente significativas (ANOVA, $P > 0,05$).

A atividade da glutathiona redutase apresentou os valores mais elevados na concentração de 5 µg CYN/mL (1,118 nmol/min/mg prot) e os mais reduzidos na concentração de 0,5 µg CYN/mL (0,813 nmol/min/mg prot) (Fig. 3.5 C). As diferenças estatisticamente significativas (teste Tukey, $P < 0,05$) foram detetadas entre a concentração de 5 µg CYN/mL e todas as restantes concentrações e o controlo.

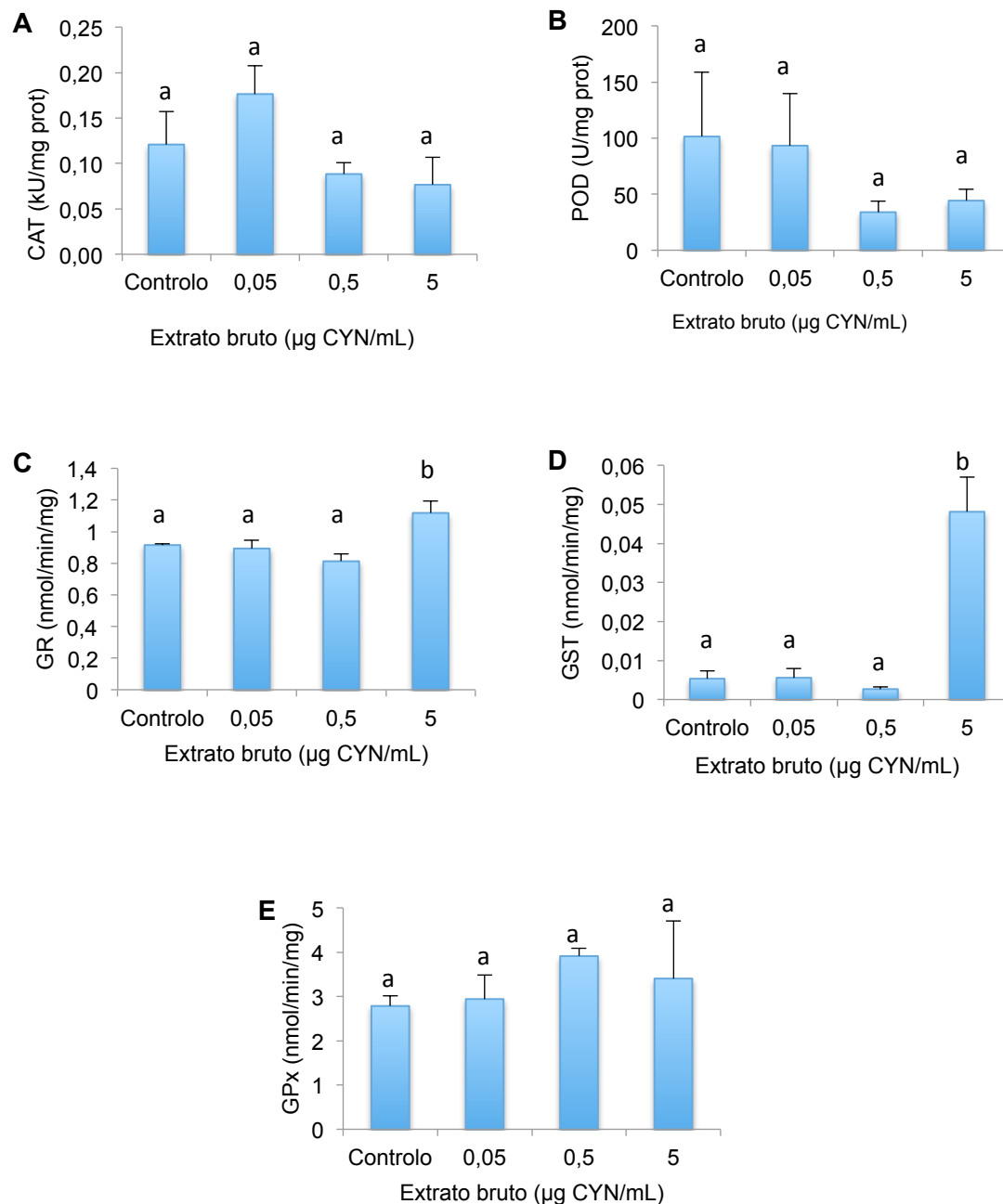


Fig. 3.5 Atividade de enzimas antioxidativas de *A. filiculoides* após exposição a extrato bruto de *A. ovalisporum* após 7 dias. A-Catalase; B-Peroxidase; C-Glutationa redutase; D-glutationa-S-transferase; E-Glutationa peroxidase. Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$). As barras representam média \pm SE ($n=3$). Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas.

A atividade da glutatona-S-transferase atingiu o maior valor na concentração de 5 µg CYN/mL (0,048 nmol/min/mg prot) e o menor valor em 0,5 µg CYN/mL (0,003 nmol/min/mg prot) (Fig. 3.5 D) As diferenças estatisticamente significativas (teste

Tukey, $P < 0,05$) foram detetadas entre a concentração de 5 μg CYN/mL com o controlo e com as concentrações de 0,05 e 0,5 μg CYN/mL.

O valor máximo da atividade enzimática da GPx foi na concentração de 0,5 μg CYN/mL (3,913 nmol/min/mg prot) e a mínima no controlo (2,785 nmol/min/mg prot) (Fig. 3.5 E), mas não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas (teste ANOVA, $P > 0,05$).

3.1.6 Bioconcentração CYN em *Azolla filiculoides*

Pela análise de CYN no meio de cultura H-40 por HPLC, as concentrações reais utilizadas foram de 0,05, 0,5 e 4 μg CYN/mL.

A análise do extrato do pteridófito por HPLC, não detetou cianotoxina nas concentrações de 0,05 e 0,5 μg CYN/mL, tendo apenas sido detetada na concentração mais elevada (5 μg CYN/mL) com o valor de 0,037 μg CYN/mL. O valor do fator de bioconcentração (FBC) foi de 0,007 (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Concentração e fator de bioconcentração de CYN nos esporófitos de *A. filiculoides*. Os dados referem-se à média \pm SE (n=3).

Extrato bruto (μg CYN/mL)	<i>A. filiculoides</i> (μg CYN/mL)	FBC
0,05	0	0
0,5	0	0
5	0,037 \pm 0,003	0,007 \pm 0,001

3.2 *Chlorella vulgaris*

3.2.1 Ensaio de exposição a duas cianotoxinas (CYN e MC-LR) em duas concentrações

3.2.1.1 Taxas de crescimento parciais

No que diz respeito ao ensaio de exposição ao extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo 0,055 μg CYN/mL, existiram diferenças significativas na taxa de crescimento parcial entre o intervalo de tempo 0-3 e o intervalo 6-10 e 10-14, entre o intervalo de tempo 3-6 e os intervalos 6-10 e 10-14 e por último diferenças entre os

intervalos de tempo 6-10 e 10-14 (Fig. 3.6 A), porém não existiram diferenças estatisticamente significativa entre o controlo e o tratamento em cada um dos intervalos de tempo (One-Way ANOVA, $P>0,05$).

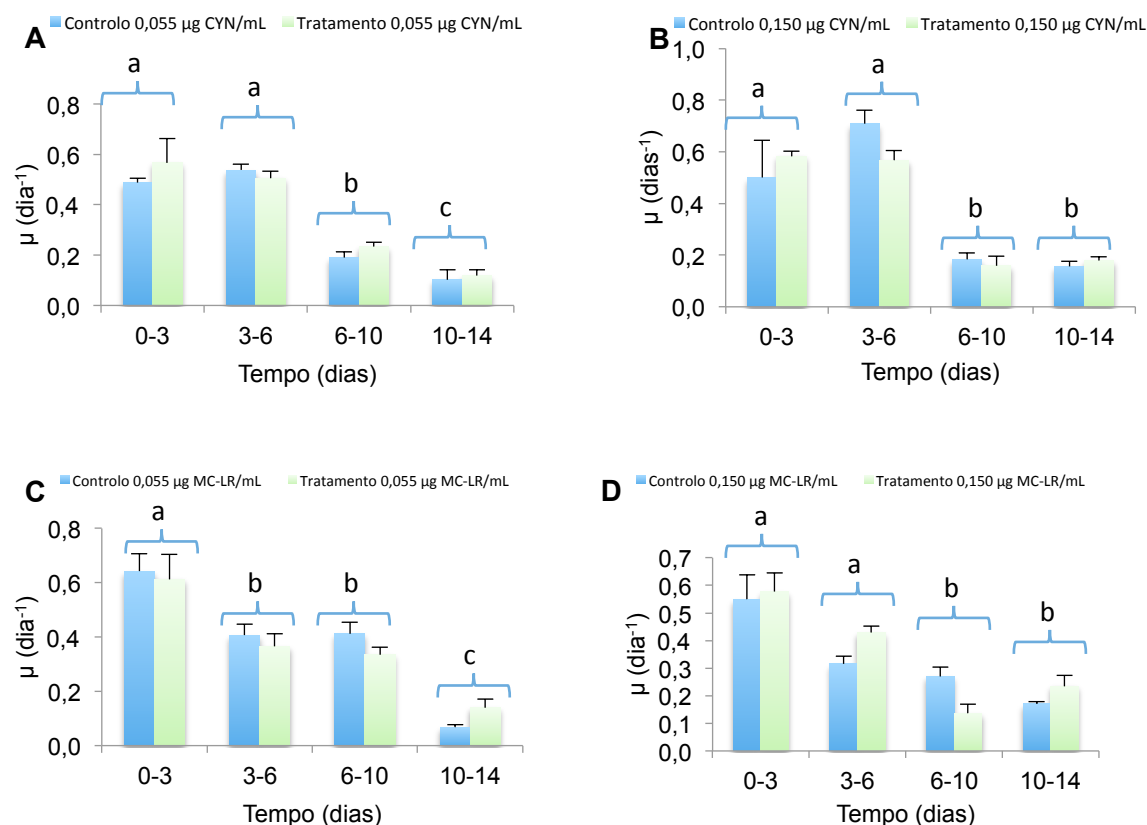


Fig. 3.6 Taxa de crescimento parcial *C. vulgaris*. A- exposição a extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo 0,055 $\mu\text{g CYN/mL}$; B- exposição a extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo 0,150 $\mu\text{g CYN/mL}$; C- exposição a extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo 0,055 $\mu\text{g MC-LR/mL}$; D- exposição a extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo 0,150 $\mu\text{g MC-LR/mL}$. As barras representam a média \pm SE ($n=4$). Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas (Two-Way ANOVA, $P<0,05$).

Já no ensaio de exposição ao extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo 0,150 $\mu\text{g CYN/mL}$, só não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas nas taxas de crescimento parciais entre os intervalos de tempo 0-3 e 3-6 e entre os intervalos de tempo 6-10 e 10-14 (Fig. 3.6 B). Porém não existiram diferenças estatisticamente significativa entre o controlo e o tratamento em cada um dos intervalos de tempo (One-Way ANOVA, $P>0,05$).

No ensaio de exposição ao extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo 0,055 $\mu\text{g MC-LR/mL}$ foram detetadas diferenças significativas nas taxas de crescimento parciais do controlo, entre os intervalos de tempo 0-3 e todos os restantes dias e entre o

intervalo 3-6 e o intervalo 10-14 e ainda entre o intervalo 6-10 e o dia 10-14 (Fig. 3.6 C). Não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito ao controlo e tratamento de cada um dos intervalos de tempo (One-Way ANOVA, $P>0,05$).

Já no ensaio de exposição ao extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo 0,150 µg MC-LR/mL verificaram-se diferenças significativas nas taxas de crescimento parciais entre os intervalos de tempo 0-3 e os intervalos 6-10 e 10-14 e ainda entre o intervalo 3-6 e os intervalos 6-10 e 10-14 (Fig. 3.6 D). Não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito ao controlo e tratamento de cada um dos intervalos de tempo (One-Way ANOVA, $P>0,05$).

3.2.1.2 Carotenóides

Na concentração de 0,055 µg CYN/mL, o valor mais elevado de carotenóides foi observado no controlo ao fim de 7 dias de exposição (51,1 µg/g PF) enquanto que na concentração de 0,150 µg CYN/mL o valor mais elevado ocorreu ao fim de 7 dias de exposição no controlo (20,9 µg/g PF). Em ambos os casos, no final da experiência (14 dias) foram observados valores negativos de carotenóides (Fig.3.7 A, B). Relativamente ao ensaio de exposição ao extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo CYN com as concentrações de 0,055 e 0,150 µg/mL, os valores do conteúdo em carotenóides não mostraram diferenças estatisticamente significativas (teste Kruskal-Wallis, $P>0,05$) entre controlo e tratamento em cada um dos tempos. Já entre cada um dos tempos (0, 7 e 14 dias) foram detetadas sempre diferenças estatisticamente significativas (Fig. 3.7 A, B) (Teste Mann-Whitney, $P<0,05$).

O valor mais elevado de carotenóides na concentração de 0,055 µg MC-LR/mL foi detetado ao fim de 7 dias de exposição no controlo (48,2 µg/g PF) e na concentração de 0,150 µg MC-LR/mL o valor mais elevado foi encontrado ao fim de 7 dias no tratamento (38,6 µg/g PF). Em ambos os casos, no final da experiência (14 dias) foram observados valores negativos de carotenóides (Fig.3.7 C, D). No ensaio de exposição ao extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo MC-LR foram detetadas diferenças estatisticamente significativas (teste Mann-Whitney, $P<0,05$) em ambas as concentrações (0,055 e 0,150 µg MC-LR/mL) entre os dias 7 e 14 (Fig. 3.7 C, D). Em cada um dos tempos de exposição não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e o tratamento (Kruskal-Wallis, $P>0,05$).

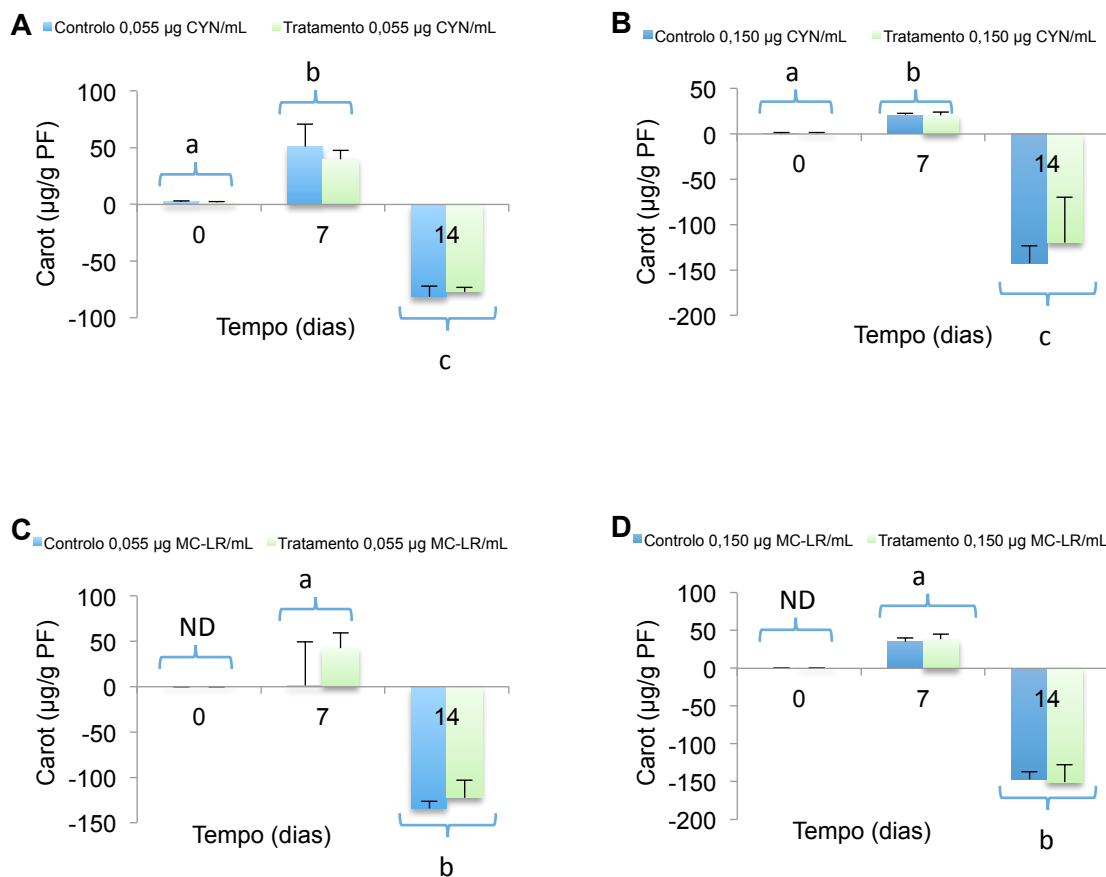


Fig. 3.7 Quantificação de carotenóides em *C. vulgaris*. A - ensaio de exposição da *C. vulgaris* ao extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo 0,055 µg CYN/mL; B - ensaio de exposição da *C. vulgaris* ao extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo 0,150 µg CYN/mL; C - ensaio de exposição da *C. vulgaris* ao extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo 0,055 µg MC-LR/mL; D - ensaio de exposição da *C. vulgaris* ao extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo 0,150 µg MC-LR/mL; As barras representam a média ± SE (n=4). Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas (Two-Way ANOVA, P<0,05). ND - Não Determinado.

3.2.1.3 Quantificação de CYN e MC-LR no meio de cultura Z8

Em relação à concentração de CYN no meio Z8 ao longo do tempo de exposição não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre controlo e tratamento nem entre tratamentos e controlos em cada dia de exposição (0, 7 e 14 dias) e entre os dias de exposição a CYN (0,055 e 0,150 µg/mL) (teste Two-Way ANOVA, P>0,05) (Fig. 3.8 A, B).

No ensaio com exposição a 0,055 µg MC-LR/mL foram detetadas diferenças estatisticamente significativas de MC-LR no meio de cultura entre o tempo inicial de exposição (0 dias) e o 7º dia de exposição bem como entre o 7º e o 14º dia de exposição (Two-Way ANOVA, P<0,05) (Fig. 3.8 C). No 14º dia de exposição foi

detetada uma diferença estatisticamente significativa entre o tratamento e o controlo. No ensaio de exposição a 0,150 µg MC-LR/mL não foram detetadas diferenças entre nenhum dos dias de exposição (Two-Way ANOVA, $P>0,05$) (Fig. 3.8 D). Apenas foi detetada uma diferença estatisticamente significativa ao 7º dia de exposição entre o controlo e o tratamento.

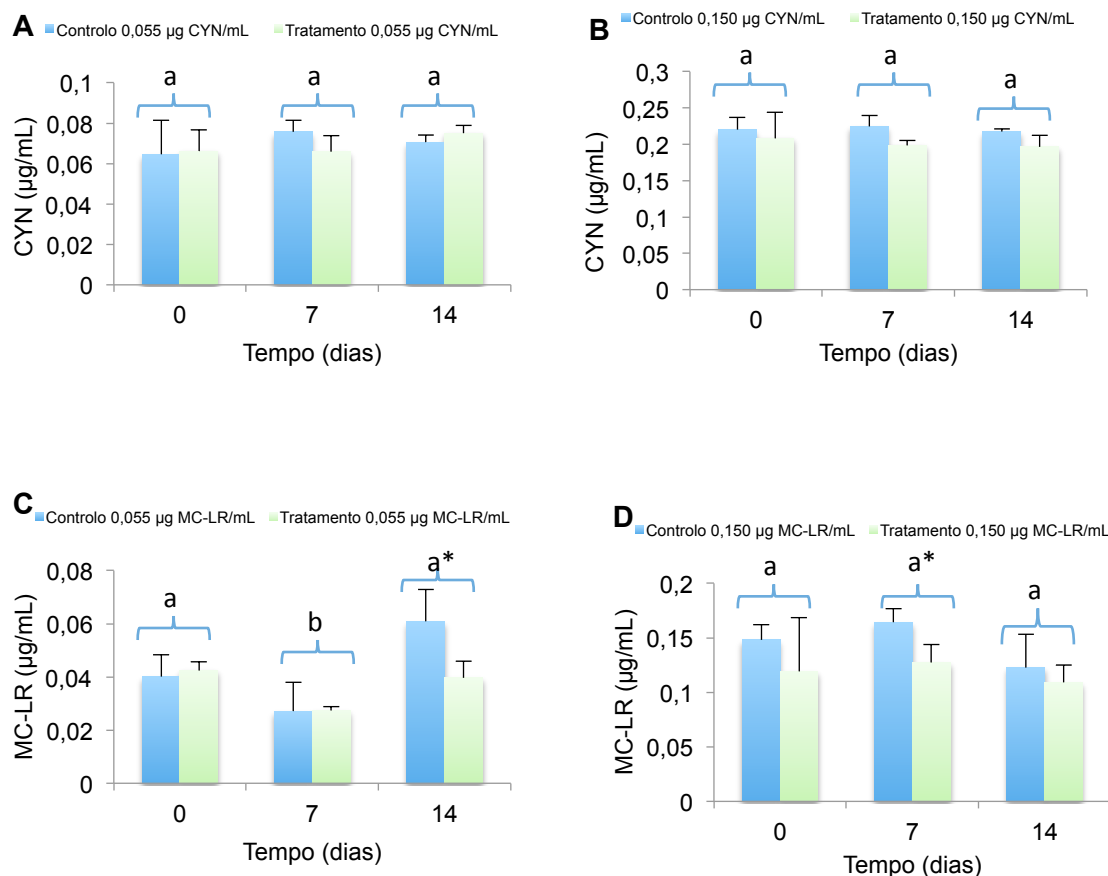


Figura 3.8 Quantificação da CYN e MC-LR no meio de cultura de *C. vulgaris* exposta aos extratos brutos de *A. ovalisporum* e *M. aeruginosa*. A- *C. vulgaris* exposta a 0,055 µg CYN/mL; B- *C. vulgaris* exposta a 0,150 µg CYN/mL; C- *C. vulgaris* exposta a 0,055 µg MC-LR/mL; D- *C. vulgaris* exposta a 0,150 µg MC-LR/mL. As barras representam a média \pm SE (n=4). Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas. Asteriscos referem-se a diferenças dentro do mesmo dia entre o controlo e o tratamento.

3.2.1.4 Quantificação de ácidos orgânicos

Após a extração em fase sólida dos ácidos orgânicos, apenas foi possível identificar o ácido succínico, por comparação com o padrão. Contudo, embora se conseguisse detetar o pico referente a este ácido nas amostras não foi possível efectuar a sua quantificação devido ao facto de ser inferior ao limite de quantificação (≤ 0.3 µg/mL) (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 –Quantificação do ácido succínico no meio Z8.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Amostra	Exposição CYN	Exposição MC-LR
0,055	Controlo (G.A)*	$\leq 0,3$	$\leq 0,3$
	Controlo (G.B)**	$\leq 0,3$	$\leq 0,3$
	Tratamento	$\leq 0,3$	$\leq 0,3$
0,150	Controlo (G.A)*	$\leq 0,3$	$\leq 0,3$
	Controlo (G.B)**	$\leq 0,3$	$\leq 0,3$
	Tratamento	$\leq 0,3$	$\leq 0,3$

* G.A- Grupo A (meio z8 com toxina)

** G.B- Grupo B (meio Z8 e *C. vulgaris*)

3.2.2 Influência da concentração dos nutrientes do meio de cultura Z8

3.2.2.1 Taxas de crescimento parciais

No ensaio em que se utilizou Z8 ½ foram detetadas diferenças estatisticamente significativas (teste Two-Way ANOVA, $P < 0,05$) na taxa de crescimento parcial entre o intervalo de tempo 10-14 e os restantes intervalos de tempo (Fig. 3.9 A).

No ensaio com Z8 ¼ foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas taxas de crescimento parciais entre os intervalos de tempo 0-3 e 3-6 e os intervalos 6-10 e 10-14 (Fig. 3.9 B).

Relativamente ao ensaio com Z8 N, P 2x, foram detetadas diferenças estatisticamente significativas (teste Two-Way ANOVA, $P < 0,05$) entre o intervalo de tempo 10-14 e todos os restantes intervalos (Fig. 3.9 C)

Em relação ao meio Z8 2x foram detetadas diferenças estatisticamente significativas (teste Two-Way ANOVA, $P < 0,05$) entre o intervalo de tempo 3-6 e todos os restantes intervalos (Fig. 3.9 D).

Para nenhum dos quatro ensaios realizados foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e o tratamento para cada um dos intervalos de tempo (teste One-Way ANOVA, $P > 0,05$).

3.2.2.2 Carotenóides

Relativamente aos carotenóides do ensaio com Z8 ½, o valor mais elevado foi registado no controlo ao 7º dia (173,0 µg/g PF). Existiram diferenças entre todos os dias de exposição (0, 7 e 14 dias) mas não se detetaram diferenças estatisticamente significativas entre controlos e tratamentos de cada um dos tempos de exposição (teste Tukey, $P < 0,05$) (Fig. 3.10 A).

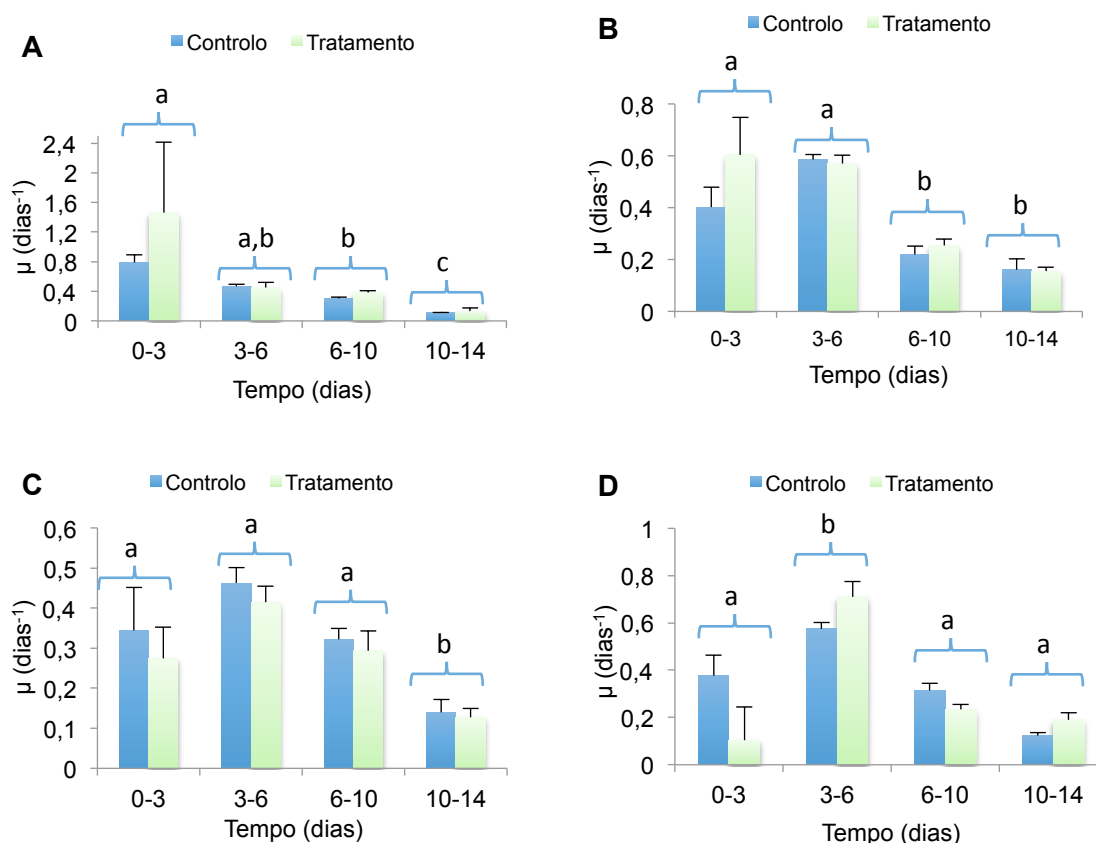


Fig. 3.9 Taxa de crescimento parcial referente ao ensaio de exposição da *C. vulgaris* a extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo 0,150 µg CYN/mL em diferentes elaborações do meio Z8, A- meio Z8 com ½ dos nutrientes; B- meio Z8 com ¼ dos nutrientes; C- meio Z8 com nitrato e fosfato em duplicado; D- meio Z8 com todos os nutrientes em duplicado. As barras representam a média ± SE (n=4). Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas.

Relativamente ao ensaio com Z8 ¼, o conteúdo mais elevado de carotenóides foi observado ao tempo 7 no controlo (39,5 µg/g PF). Foram detetadas diferenças estatisticamente significativas (teste Mann-Whitney, $P < 0,05$) entre os dias de exposição (0, 7 e 14 dias), não existindo diferenças significativas entre controlos e tratamentos de cada um dos tempos de exposição (teste Kruskal-Wallis, $P > 0,05$). (Fig. 3.10 B).

No ensaio realizado com Z8 2xNF, o conteúdo em carotenóides obteve o seu valor máximo no controlo ao fim de 7 dias (150,8 $\mu\text{g/g}$ PF). Existiram diferenças estatisticamente significativas entre os 3 tempos de exposição (0, 7 e 14 dias) e ainda foram detetadas no 7º dia de exposição diferenças entre o controlo e o tratamento (Fig. 3.10 C) (teste Tukey, $P < 0,05$).

No ensaio em que todos os nutrientes do meio Z8 foram duplicados, o conteúdo de carotenóides mais elevado foi observado ao 7º dia de exposição no tratamento (61,4 $\mu\text{g/g}$ PF). Diferenças estatisticamente significativas foram detetadas entre todos os dias de exposição (0, 7 e 14 dias) (teste Tukey, $P < 0,05$). Já entre o controlo e tratamento não foi detetada nenhuma diferença em nenhum dos dias (teste One-Way ANOVA, $P > 0,05$) (Fig. 3.10 D).

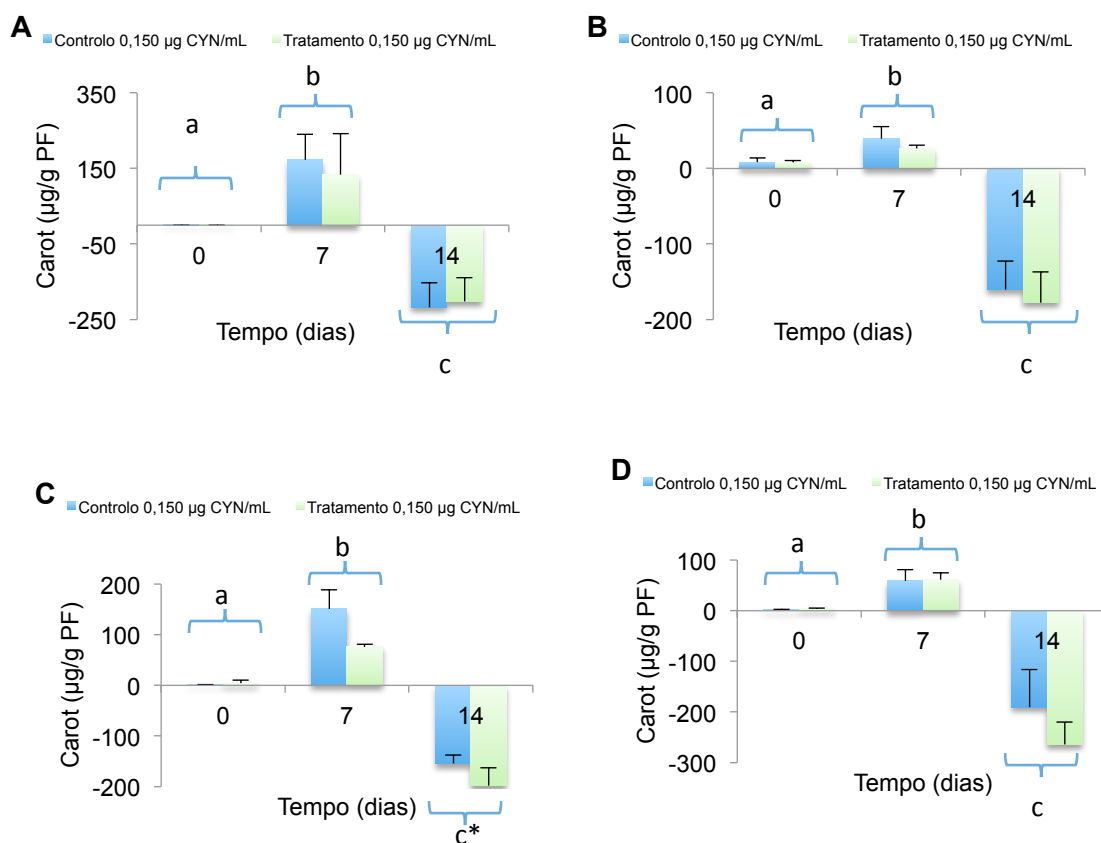


Fig. 3.10 Quantificação de carotenóides. A – ensaio de exposição da *C. vulgaris* ao extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo 0,150 μg CYN/mL em $\frac{1}{2}$ de meio Z8; B - ensaio de exposição da *C. vulgaris* ao extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo 0,150 μg CYN/mL em $\frac{1}{4}$ de meio Z8; C - ensaio de exposição da *C. vulgaris* ao extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo 0,150 μg CYN/mL em meio Z8 com nitrato e fosfato em duplicado; D - ensaio de exposição da *C. vulgaris* ao extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo 0,150 μg CYN/mL em meio Z8 com todos os nutrientes em duplicado. As barras representam a média \pm SE ($n=4$). Letras diferentes referem-se a diferenças estatísticas. Asterisco refere-se a diferenças significativas entre controlo e tratamento.

Em todos os ensaios, no final da experiência (14 dias) foram observados valores negativos de carotenóides (Fig. 3.10 A, B, C e D).

3.2.2.3 Quantificação de CYN

No ensaio realizado com Z8 ½ não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas (teste Two-Way ANOVA, $P>0,05$) para a concentração de CYN no meio de cultura entre cada tempo de exposição (0, 7 e 14 dias) (Fig. 3.11 A).

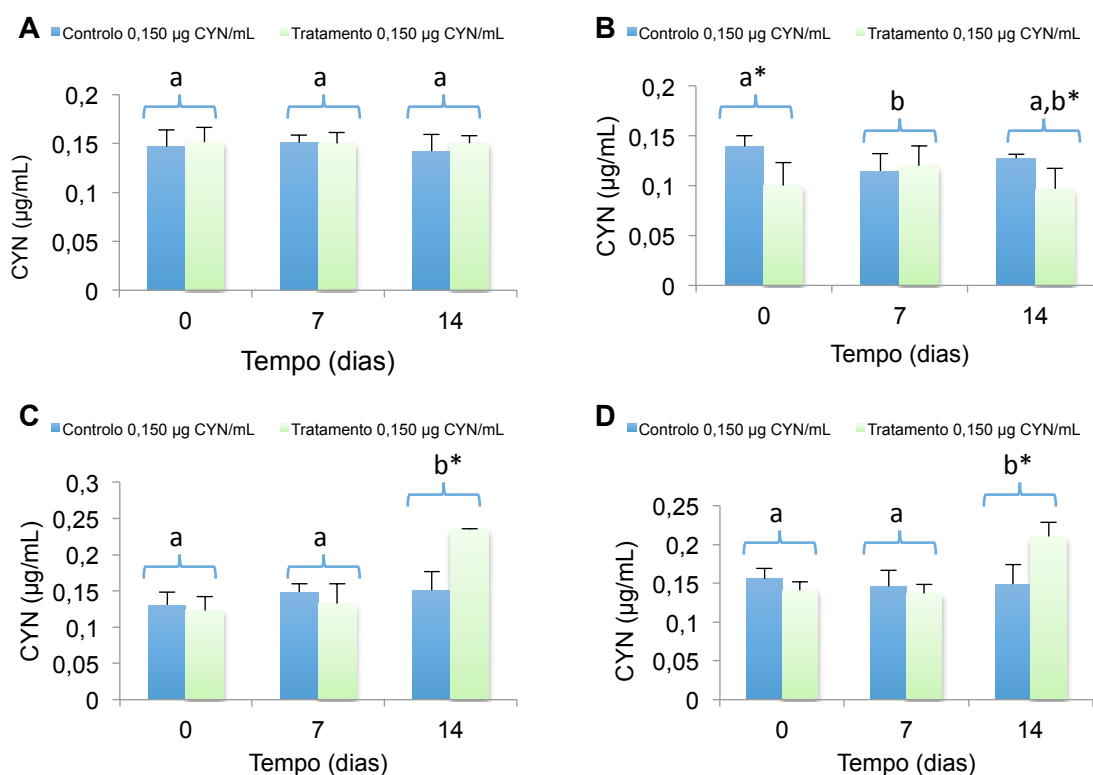


Figura 3.11 Quantificação da CYN no meio de cultura da *C. vulgaris* exposta ao extrato bruto de *A. ovalisporum*. A- ensaio realizado com metade dos nutrientes do meio Z8; B- ensaio realizado com ¼ dos nutrientes do meio Z8; C- ensaio realizado com nitrato e fosfato em duplicado; D- ensaio realizado com todos os nutrientes duplicados. Letras diferentes referem-se a diferenças significativas. Asteriscos referem-se a diferenças estatísticas entre controlo e tratamento no mesmo dia. As barras representam a média \pm SE (n=4). Letras diferentes referem-se a diferenças estatísticas. Asterisco refere-se a diferenças significativas entre controlo e tratamento.

Já no ensaio realizado com o meio Z8 a ¼ foram detetadas diferenças significativas (teste Two-Way ANOVA, $P<0,05$) entre o dia inicial de exposição (0 dias) e o 7º dia de exposição (Fig. 3.11 B). No dia inicial de exposição (0 dias) e no 14º dia o

tratamento e o controlo apresentaram diferenças estatisticamente significativas (teste Tukey, $P < 0,05$).

Relativamente ao ensaio realizado com o nitrato e fosfato em duplicado foram detetadas diferenças significativas (teste Two-Way ANOVA, $P < 0,05$) no valor de CYN no meio de cultura entre o 14º dia de exposição e o 7º dia e o tempo inicial (0 dias). Para além disso observaram-se diferenças estatisticamente significativas (teste Tukey, $P < 0,05$) no 14º dia de exposição entre o controlo e o tratamento (Fig. 3.11 C).

A análise estatística realizada ao valor de CYN no meio Z8 com todos os nutrientes em duplicado detetou-se diferenças significativas (teste Two-Way ANOVA, $P < 0,05$) entre o 14º dia e os restantes tempos (0 e 7 dias). Para além disso observaram-se diferenças estatisticamente significativas (teste Tukey, $P < 0,05$) no 14º dia de exposição entre o controlo e o tratamento (Fig. 3.11 D).

4. Discussão

4.1 *Azolla filiculoides*

4.1.1 Taxa de crescimento

A exposição de *A. filiculoides* durante 7 dias ao extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo CYN revelou que a maior taxa de crescimento se encontrava na concentração de 0,5 µg CYN/mL embora esta não apresentasse diferenças estatisticamente significativas comparativamente com o controlo e com a concentração de 0,05 µg CYN/mL. Por outro lado, existiu um decréscimo acentuado na concentração de 5 µg CYN/mL.

Vários estudos com MCs demonstram que plantas com exposição de curta ou prolongada duração a cianotoxinas apresentam inibição de crescimento. No caso da CYN não são encontrados estudos sobre a sua toxicidade. Beyer et al. (2009) mostraram que a CYN pura em concentrações entre 0,5 a 40 µg/mL alterava o crescimento do macrófito aquático *Phragmites australis* causando inibição e alongamento das raízes e parte aérea. Na presente investigação, foi utilizado um extrato bruto que para além de CYN possui outros metabolitos que poderão induzir alterações na planta mas que podem não se dever à toxicidade da CYN. Já Vasas et al. (2002) estudaram *Sinapsis alba* que quando exposta a uma concentração de 18,2 µg CYN/mL o crescimento era inibido. No presente estudo, foi observado um decréscimo aos 5 µg CYN/mL.

4.1.2 Clorofilas e carotenóides

O pteridófito *A. filiculoides* apresentou maior teor em clorofila *a* na concentração de 5 µg CYN/mL e menor na concentração de 0,05 µg CYN/mL. Já a clorofila *b*, apresentou maior teor na concentração de 5 µg CYN/mL e menor na concentração de 0,05 µg CYN/mL. O total de clorofilas exibiu um aumento na concentração de 5 µg CYN/mL e uma diminuição na concentração de 0,05 µg CYN/mL.

O valor mais elevado de carotenóides foi observado na concentração de 5 µg CYN/mL.

O rácio clorofila *a/b* teve o seu valor máximo na concentração de 0,5 µg/mL e um decréscimo na concentração de 5 µg CYN/mL, enquanto que o rácio

clorofilas/carotenóides apresentou o valor mais baixo na concentração de 5 µg CYN/mL.

De acordo com Lichtenthaler & Buschmann (2001) a clorofila *a* está presente nos centros de reação do fotossistema I e II e nos pigmentos antena enquanto que a clorofila *b* se encontra exclusivamente nos pigmentos antena. O rácio clorofila *a/b* é um indicador funcional de pigmentos e um indicador de adaptação à luz do sistema fotossintético. Os carotenóides são importantes na medida em que protegem as clorofilas do excesso de luz e da foto oxidação. O rácio clorofilas/carotenóides é um indicador do estado fisiológico da planta (senescência, *stress*, danos na planta e fotossíntese). O total de clorofilas elucidam-nos sobre o que acontece em todas as concentrações incluindo o controlo.

No presente estudo, os dados anteriormente referidos podem indicar que no caso das clorofilas, a concentração de CYN interferiu no seu conteúdo o que poderá levar a alterações na fotossíntese. Porém, o rácio clorofila *a/b* pode indicar que não existiram efeitos ao nível da fotossíntese. Relativamente aos carotenóides os resultados obtidos devem-se provavelmente a uma resposta ao *stress* causado pela quantidade de cianotoxina presente no meio de cultura. Os valores que se obteve no rácio clorofilas/carotenóides não foram indicativos de senescência, *stress*, danos na planta ou no mecanismo fotossintético.

4.1.3 Ficobiliproteínas

As ficobiliproteínas são proteínas solúveis em água presentes em algas e cianobactérias e são maioritariamente utilizadas como pigmentos antena para captação de luz. Dependendo da sua cor, são divididas em dois grupos, a ficoeritrina (vermelho) e a ficocianina (azul). Todas as ficobiliproteínas absorvem a luz incidente e adicionalmente participam numa cadeia de transferência de energia dentro dos ficobilissomas, desde ficoeritrocianina (PEC), ficocianina (PC), aloficocianina (APC) e clorofila *a*.

No que diz respeito à PC e APC os valores mais elevados foram detetados na concentração de 0,5 µg CYN/mL e na PEC os valores mais elevados na concentração de 5 µg CYN/mL. Diferenças de conteúdo de ficobiliproteínas podem induzir alterações no sistema fotossintético II (PS II) (Kaplan et al. 1986). Estes resultados poderão evidenciar uma maior vulnerabilidade por parte da PC e APC e uma menor vulnerabilidade da PEC, visto que a última só aumentou

consideravelmente na concentração de 5 µg CYN/mL. Pode-se dizer que possivelmente não existiram diferenças ao nível da fotossíntese.

4.1.4 Proteínas

O conteúdo de proteínas com extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo CYN após 7 dias de ensaio em *A. filiculoides*, revelou diferenças estatisticamente significativas, com um valor máximo de conteúdo proteico na concentração de 5 µg CYN/mL comparativamente com todas as restantes concentrações (0,05, 0,5 µg CYN/mL) e controlo. O extrato bruto e os metabolitos presentes provavelmente não inibiram a síntese proteica.

4.1.5 Atividade das enzimas do sistema antioxidativo

De acordo com Asada (1999), ROS podem ser geradas pela transferência direta de energia de excitação a partir das clorofilas para produzir oxigénio ou pela redução do oxigénio do fotossistema I (PS I). As ROS são extremamente reativas e na ausência de qualquer mecanismo protetor podem interromper o metabolismo através de danos oxidativos nos lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. Masood et al. (2005) apontam para que os mecanismos protetores envolvidos pela planta possam manter os efeitos prejudiciais dos radicais livres a um nível mínimo durante condições de *stress*. Já Halliwell (2006) refere que as enzimas antioxidativas protegem as plantas contra condições de *stress* removendo os radicais livres produzidos.

No presente estudo, a atividade da catalase (CAT) apresentou uma maior atividade na concentração de 0,05 µg CYN/mL e o menor valor no tratamento com a concentração de 5 µg CYN/mL não existindo diferenças estatisticamente significativas. A peroxidase (POD) teve o seu valor mais elevado no controlo e o valor mais baixo na concentração de 0,5 µg CYN/mL. A glutathione peroxidase (GPx) apresentou um valor superior na concentração de 0,5 µg CYN/mL e um valor inferior no controlo. Os resultados obtidos podem ser indicativos de que a planta poderá estar a usar outros mecanismos de destoxificação ou que muito embora esteja na presença de CYN esta possa não estar a provocar alterações ao nível de *stress* oxidativo e por consequência possa não afetar a CAT, POD e GPx.

A glutathione redutase (GR) apresentou os valores mais elevados na concentração de 5 µg CYN/mL e os mais baixos na concentração de 0,5 µg CYN/mL. Diferenças estatisticamente significativas foram detetadas entre a concentração de 5 µg CYN/mL e todas as restantes concentrações (0,05 e 0,5 µg CYN/mL) incluindo o controlo. A glutathione-S-transferase (GST) apresentou valores mais elevados na concentração de 5 µg CYN/mL e um decréscimo na concentração de 0,5 µg CYN/mL. Diferenças estatisticamente significativas foram detetadas entre a concentração de 5 µg CYN/mL e entre todas as restantes concentrações (0,05 e 0,5 µg CYN/mL) e controlo.

Estas enzimas desempenham um papel fundamental na proteção contra danos oxidativos (Gamble & Burke, 1984). O facto de se ter um valor alto na maior concentração pode ser indicativo de que a planta está a detoxificar as ROS, sendo indicativo de uma resposta ao *stress* oxidativo (Stüven & Pflugmacher, 2007; Prieto et al., 2011).

Os resultados obtidos têm de ter em consideração as características do extrato cianobacteriano, ou seja, as alterações observadas podem ter sido mediadas pela ação da CYN como também por outros metabolitos bioativos presentes no extrato.

4.2 *Chlorella vulgaris*

4.2.1 Bioensaio de exposição ao extrato bruto de *A. ovalisporum*

Neste ensaio com extrato bruto de CYN as taxas de crescimento parciais, para o bioensaio de exposição de 0,055 e de 0,150 µg/mL, decresceram a partir do 6º dia. É comum a ambos os bioensaios não existirem diferenças nas taxas de crescimento parciais nos intervalos de tempo 0-3 e 3-6.

Pode-se supor que, como a densidade celular no tempo inicial foi de 1×10^5 céls/mL e o volume total de meio Z8 utilizado para cada réplica durante o ensaio foi de 50 mL, estes dois fatores tenham tido influência sob o crescimento e multiplicação celular, pois provavelmente se fosse utilizado uma densidade celular superior os resultados poderiam também ser diferentes pois teríamos uma maior quantidade de células.

Um estudo semelhante realizado por Pinheiro et al. (2013), em que a microalga *C. vulgaris* foi exposta durante 7 dias a 6 diferentes concentrações de extrato bruto de

CYN numa placa de 96 poços e com um volume total de 200µL, revelou que só na concentração mais elevada (2,5 mg CYN/L) é que as células eram drasticamente afectadas, enquanto que as restantes concentrações (0,005, 0,0025, 0,05, 0,25 e 0,5 mg/L) levaram a um aumento das taxas de crescimento. Embora duas das concentrações utilizadas neste estudo se encontrem dentro da mesma gama das concentrações utilizadas no nosso estudo, é de salientar que tanto o volume (200 µL) como a densidade celular (5×10^5 céls/mL) são bastante diferentes, o que pode justificar o facto de não se ter observado no presente estudo um aumento na taxa de crescimento parcial.

Outros estudos realizados por Papke et al. (1997), Ikawa et al. (2001), Valdor & Aboal (2007) demonstraram o efeito inibitório de um extrato cianobacteriano no crescimento de microalgas, mas no presente estudo, não se pode afirmar ter existido um efeito inibitório pelo extrato cianobacteriano no crescimento da microalga, pois consegue-se observar que não existiram ao longo dos dias diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e o tratamento.

De acordo com Chiswell et al. (1999), a cilindrospermopsina é relativamente estável na escuridão. Contudo à luz solar e na presença de pigmentos mais de 90% de CYN é degradada entre 2 a 3 dias. Este pode ter sido também um fator que interferiu no presente ensaio, fazendo com que não fossem observadas diferenças significativas entre o controlo e o tratamento.

4.2.2 Bioensaio de exposição ao extrato bruto de *M. aeruginosa*

No presente ensaio com extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo MC-LR, as taxas de crescimento parciais da microalga na exposição a 0,055 µg MC-LR/mL decresceram a partir do 6º dia, contudo apresentou uma menor taxa parcial no intervalo de tempo 10-14 não existindo diferenças significativas entre controlo e tratamento. No bioensaio de exposição a 0,150 µg MC-LR/mL verificou-se um decréscimo na taxa de crescimento a partir do 6º dia e uma recuperação no final do ensaio, não existindo diferenças significativas entre controlo e tratamento. Campos et al. (2013) realizaram um estudo com extratos brutos de *A. ovalisporum* e *M. aeruginosa* em *C. vulgaris*. Na exposição a um extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo 41,5 µg MC-LR/L, ocorreu uma estimulação no crescimento de *C. vulgaris* após uma exposição de 3 e 7 dias. Contrariamente, no presente estudo, existiu sempre um decréscimo ao longo de todo o ensaio, com exceção do ensaio com *M.*

aeruginosa contendo 0,150 µg MC-LR/mL em que houve uma recuperação no final do ensaio.

De acordo com Mohamed (2008), após 3 dias de exposição a um extrato bruto de MCs e MC-LR pura foi observada uma resposta inibitória em *C. vulgaris* e *S. quadricauda*, contudo os 4 dias subsequentes foram o suficiente para as culturas de microalgas recuperarem as densidades celulares equivalentes às do controlo.

Os presentes ensaios não só demonstraram um decréscimo nas culturas expostas a extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo MC-LR como também mostraram existir um decréscimo nas culturas controlo (não expostas a extrato cianobacteriano). A inibição nos ensaios pode dever-se a vários fatores como por exemplo, luz, temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes, entre outros.

O facto de ter sido utilizada uma densidade celular de 1×10^5 também pode ter sido um fator crucial no sentido em que densidades superiores poderiam potenciar a recuperação das taxas de crescimento parciais.

4.2.3 Bioensaio de exposição ao extrato bruto de *A. ovalisporum* no meio Z8 modificado

No presente bioensaio observou-se que a taxa de crescimento parcial da *C. vulgaris*, quando exposta a 0,150 µg CYN/mL e em meio Z8 com concentração de nutrientes reduzida a metade foi sempre decrescendo ao longo dos dias tal como verificado para a cultura controlo.

No ensaio em que o meio Z8 continha apenas $\frac{1}{4}$ dos nutrientes que compõem este meio, os resultados foram bastante semelhantes aos observados no ensaio com $\frac{1}{2}$ dos nutrientes.

Relativamente ao ensaio em que se duplicou dois dos componentes do meio Z8 (nitrato e fosfato), os resultados observados foram distintos dos obtidos para os ensaios com Z8 $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$. Neste ensaio não existiram diferenças estatisticamente significativas nas taxas de crescimento parciais nos intervalos de tempo 0-3, 3-6 e 6-10, mas diminuiu no intervalo entre 10-14 dias, tendo esse intervalo apresentado diferenças estatisticamente significativas dos restantes intervalos.

No ensaio em que foram duplicados todos os nutrientes que compõem o meio Z8, a taxa de crescimento parcial foi maior no intervalo 3-6 dias.

É de ressaltar que não existe qualquer estudo realizado com meio Z8 nestas 4 condições ($\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, nitrato e fosfato duplicados e todos os nutrientes duplicados) e com intoxicação com CYN.

Porém, existem estudos para perceber qual o melhor meio de cultura para se obter uma maior quantidade de biomassa. No estudo de Chia et al. (2013) que com a necessidade de produção de algas ecologicamente rentáveis, submeteram *C. vulgaris* a três meios de cultura (LC Oligo, Chu 10 e WC), ocorrendo um maior crescimento e produção de biomassa no meio LC Oligo.

Já Rattanapoltee & Kaewkannetra (2014), submeteram *C. vulgaris* a condições de cultura diferentes utilizando um meio autotrófico (carbono, fonte de azoto e nitrato de sódio), heterotrófico (carbono, fonte de azoto, sucrose e nitrato de sódio) e mixotrófico (nitrato de sódio). A *C. vulgaris* exposta ao meio mixotrófico foi a que obteve maior produção de biomassa.

Por outro lado, Chu et al. (2013) utilizaram meios com diferentes concentrações de fósforo e azoto para o cultivo de *C. vulgaris*. Este estudo demonstrou que a adição de fósforo ao meio de cultura levava a um aumento da biomassa.

Na presente investigação, não foram detetadas diferenças entre controlo e tratamento, o que leva a concluir que a alteração do meio nutricional não tem efeitos na toxicidade do extrato bruto de *A. ovalisporum*. Pode-se supor que outros fatores externos (temperatura, luz, pH) possam ter interferido no decréscimo geral das taxas de crescimento, assim como outros metabolitos presentes no extrato bruto utilizado para todos os ensaios.

4.2.4 Quantificação de carotenóides

Para todos os bioensaios realizados no presente estudo (ensaio de exposição ao extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo 0,055 e 0,150 µg CYN/mL, ensaio de exposição ao extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo 0,055 e 0,150 µg MC-LR/mL) existiram diferenças estatisticamente significativas entre o tempo inicial (0 dias) o 7º e 14º dias, com um aumento no 7º dia e valores negativos ao 14º dia. Não se pode referir que não existem carotenóides no final do ensaio devido aos valores negativos, contudo no protocolo utilizado para a quantificação de carotenóides a fórmula de cálculo incluía o cálculo da clorofila *a* e *b*, valores que podem ter interferido com a quantificação dos carotenóides. O teor em clorofila *b* a partir do 7º dia aumentou e no 14º dia apresentava valores muito superiores à clorofila *a*,

fazendo com que o rácio clorofila *a/b* fosse extremamente baixo. Este rácio é considerado por Lichtenthaler et al. (1981) como um indicador do funcionamento dos pigmentos acessórios e da adaptação à luz do mecanismo fotossintético. A clorofila *a* é a principal responsável pela fotossíntese, sendo que a clorofila *b* (pigmento antena) apenas auxilia na captação de luz e na transferência de energia para os centros de reação. Quando este rácio diminui pode ser um indicador de modificações no sistema antena do fotossistema II (PS II) (Lichtenthaler & Buschmann, 2001). Um outro fator importante é a intensidade de luz onde a microalga se desenvolveu que pode ter levado a que não existisse uma adaptação da microalga e não houvesse um ajuste do sistema fotossintético.

Mohamed (2008) analisou *C. vulgaris* e *Scenedesmus quadricauda* a concentrações ambientalmente relevantes de MC-LR puro e extrato bruto. Ambas apresentaram uma inibição da taxa de crescimento incluindo um decréscimo significativo nos pigmentos fotossintéticos como clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides. Tal como na presente investigação este ensaio teve a duração de 14 dias e ao 7º dia, contrariamente aos resultados obtidos, os valores da clorofila *a* mantiveram-se superiores aos da clorofila *b* e os valores dos carotenóides positivos devido aos valores superiores da clorofila *a* relativamente à *b*. Para que este problema fosse ultrapassado, um novo protocolo ou a optimização do protocolo utilizado teriam de ser elaborados. Biehler et al. (2010) refere que para se ultrapassar uma sobreavaliação do conteúdo de carotenóides pela presença das clorofilas é muitas vezes incluída a saponificação durante a extração, mesmo que isso leve a perdas de carotenóides.

4.2.5 Ácidos orgânicos

Não são conhecidos estudos publicados sobre a quantificação de ácidos orgânicos em meio de cultura Z8 onde foram realizados os bioensaios com *C. vulgaris* exposta a extratos brutos de cianobactérias como a *A. ovalisporum* e a *M. aeruginosa* contendo CYN e MC-LR respetivamente.

O método utilizado nesta determinação foi efetuado de acordo com Rocha et al. (2013) para a determinação de ácidos orgânicos em solução aquosa de exsudados radiculares de plantas. Dos 8 ácidos (oxálico, cítrico, málico, malónico, succínico, fórmico e acético) apenas o succínico foi detetado no presente estudo nas amostras; contudo a sua quantificação não foi possível porque o seu valor se situava abaixo do

limite de quantificação. Vários fatores podem ter interferido, como se ter utilizado meio Z8, em que os nutrientes podem ter interferido na purificação e pré-concentração dos ácidos orgânicos e nos cromatogramas pode ter provocado o efeito de matriz ocultando a presença de alguns ácidos. Outro problema pode ter sido o facto deste protocolo ter sido utilizado em plantas que possuem raízes enquanto que a *C. vulgaris* não tem raízes. A evaporação do solvente das amostras por vácuo pode ter levado a uma volatilização dos ácidos orgânicos e por consequência ser impossível a sua identificação e quantificação. Para a análise de ácidos orgânicos em meio Z8 seria necessária uma optimização de protocolo e de metodologias.

Masini et al. (2011) determinaram ácidos orgânicos nos extratos intracelulares e no meio de cultura das algas marinhas *Tetraselmis gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum* por cromatografia líquida de interação lipídica (HILIC) separando os ácidos orgânicos, principalmente o ácido glicólico.

4.3 Fitorremediação

No que às plantas diz respeito, os efeitos da CYN e de extratos cianobacterianos são relativamente pouco conhecidos.

O pteridófito *A. filiculoides* devido à sua distribuição mundial, elevada produção de biomassa, capacidade de absorção e concentração de metais pesados e metalóides de meios aquosos, pode ser sugerida como sendo uma candidata apropriada e com grande potencial de uso na fitorremediação (Vafaei et al. 2012).

Vários estudos sobre o potencial de fitorremediação de metais pesados e nutrientes por *A. filiculoides* têm surgido ao longo do tempo (Sela et al., 1989; Zhao et al., 1999; Rakhshaei et al., 2006; Song et al., 2012), contudo no que diz respeito à acumulação de cianotoxinas, nomeadamente a cilindrospermopsina nada se conhece.

O fator de bioconcentração é uma forma de medir a bioacumulação de xenobióticos e toxinas no organismo, sendo que só é considerada a existência de bioacumulação num sistema biológico quando o fator de bioconcentração é superior a 1 (Pietro et al. 2011).

Um estudo realizado por White et al. (2005) na macrófita aquática *H. verticillata* detetaram a presença de CYN nos tecidos da planta aquática com um fator de

bioconcentração de 0,045, que sendo inferior a 1 puderam concluir que não houve bioacumulação de CYN. Um outro estudo realizado por Pietro et al. (2011) onde *Oryza sativa* foi exposta a um extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo CYN após 48 horas de exposição detetou a cianotoxina nas raízes e parte aérea da planta, com um fator de bioconcentração de 0,82 e 0,68 respetivamente. Este estudo sugere a existência de um *uptake* de CYN da molécula pelas raízes e posterior translocação para as folhas, mas como o fator de bioconcentração foi inferior a 1, não ocorreu acumulação de CYN pelo arroz.

No ensaio realizado com a *A. filiculoides* exposta ao extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo CYN apenas na concentração de 5 µg CYN/mL foi detetado um fator de bioconcentração de 0,007. Mas, tal como anteriormente, como é um valor inferior a 1, não pode ser considerada a existência de acumulação.

As microalgas tem sido utilizadas para remoção de matéria orgânica e nutrientes orgânicos de águas residuais mas o local de desenvolvimento e crescimento influencia o potencial e capacidade de biotransformação e acumulação. Portanto, se as microalgas crescerem em ambientes poluídos podem demonstrar uma maior capacidade de tolerância aos poluentes. As microalgas que mais têm sido estudadas são as pertencentes ao género *Chlorella* muito embora, espécies diferentes possuam também diferentes capacidades de remoção de poluentes (Gao et al. 2011). Porém não existem estudos sobre a capacidade de acumulação ou biotransformação de CYN e MC-LR por *C. vulgaris*.

Gong et al. (2011) verificaram que as algas podem promover a sedimentação das nanopartículas de óxido de níquel no ambiente e apresentam potencial para remediação de nano poluentes. Lim et al. (2010) verificaram que *C. vulgaris* removeu o corante têxtil de águas residuais entre os 41,8 a 50%.

Na presente investigação o extrato bruto de *A. ovalisporum* não revelou diminuição de CYN no meio de cultura. No ensaio com extrato bruto de *M. aeruginosa* revelaram-se diferenças estatisticamente significativas na concentração de 0,055 µg MC-LR/mL ao 7º dia entre controlo e tratamento, sendo também detetadas diferenças estatisticamente significativas entre tratamento e controlo na concentração de 0,150 µg MC-LR/mL ao 14º dia. Estas diferenças quer na concentração de 0,055 e 0,150 µg MC-LR/mL podem dever-se à metodologia experimental.

Por outro lado, nos ensaios em que foram utilizados 4 formulações do meio Z8 (Z8 $\frac{1}{2}$, Z8 $\frac{1}{4}$, Z8 2xNF e Z8 2xN) e em que a *C. vulgaris* foi exposta ao extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo 0,150 μg CYN/mL, muito embora não tenham sido registadas diferenças estatisticamente significativas houve um relativo aumento no ensaio com meio Z8 2xNF e Z8 2x no primeiro dia. Porém, estes dados podem talvez dever-se ao facto de existir uma pequena percentagem de células não lisadas fazendo com que aumente a concentração da CYN no meio de cultura (Joana Azevedo, comunicação pessoal). Campos et al. (2013) referiram que no extrato bruto de *A. ovalisporum* é possível que haja uma ação sinérgica entre a CYN e outros metabolitos produzidos pela cianobactéria. Como não foi analisada a biomassa de *C. vulgaris* no final do ensaio não se pode afirmar se houve ou não bioacumulação de CYN pela microalga.

5. Conclusão

Com a elaboração deste trabalho de investigação conclui-se que:

- O crescimento do pteridófito *A. filiculoides* foi inibido na concentração mais elevada de CYN.
- A presença de CYN interferiu no conteúdo de clorofilas e carotenóides de modo estatisticamente significativo tendo em conta que à medida que a concentração aumentava, o conteúdo destes pigmentos fotossintéticos também aumentava em *A. filiculoides*.
- No que diz respeito às ficobiliproteínas do cianobionte *A. azollae* não existiram diferenças estatisticamente significativas pelo que a CYN não afetou estes pigmentos.
- Alterações no conteúdo proteico de *A. filiculoides* foram evidentes à medida que a concentração aumentava sendo mais evidente na concentração máxima o que pode parece indicar que a CYN não inibiu a síntese proteica.
- Em relação às enzimas do sistema antioxidativo de *A. filiculoides* apenas a GST e GR apresentaram diferenças estatisticamente significativas, os resultados podem ser indicativos de uma possível resposta ao *stress* oxidativo induzida pela CYN, tendo esta possivelmente desencadeado um aumento nas espécies reativas de oxigénio.
- A análise por HPLC detetou a presença de CYN no pteridófito contudo o fator de bioconcentração é inferior a 1, pelo que se pode supor que a *A. filiculoides* não bioacumulou CYN, demonstrando não ser uma boa opção para fitorremediação desta toxina.
- Em relação à *C. vulgaris* tanto nos ensaios com CYN como com MC-LR, existiu decréscimo na taxa de crescimento, embora sem nunca se terem detetado diferenças estatisticamente significativas entre o tratamento e o controlo.
- No ensaio realizado com diferentes concentrações de nutrientes de meio Z8 também se obteve um decréscimo na taxa de crescimento de *C. vulgaris* sendo esse decréscimo mais evidente no bioensaio com Z8 ½. Concluímos que a variação de nutrientes nos ensaios de exposição não interferiram na toxicidade do extrato bruto de *A. ovalisporum* contendo CYN.
- Existiu claramente uma diferença no conteúdo dos carotenóides ao longo do ensaio, essa diferença pode dever-se a uma resposta ao stress causado pela exposição à CYN.

- A quantificação da toxina no meio por HPLC, não sustentou a hipótese da fitorremediação pela microalga *C. vulgaris*.

6. Referências

- Aslan, S. & Kapdan, I. K. 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*. 28: 64-70.
- Ashworth, C.T. & Mason, M.F. 1946. Observations on the pathological changes produced by a toxic substance present in blue- green algae (*Microcystis aeruginosa*). *American Journal of Pathology*. 22: 369–383.
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology*. 50: 601-639.
- Azooz, M.M., Ismail, A.M. & Elhamd, M.F.A. 2009. Growth, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities as a selection criterion for the salt tolerance of maize cultivars grown under salinity stress. *International Journal of Agriculture & Biology*. 11: 21-26.
- Babica, P., Hilscherová, K., Bártová, K., Bláha, L. & Maršálek, B. 2007. Effects of dissolved microcystins on growth of planktonic photoautotrophs. *Phycologia*. 46: 137-142.
- Banker, R., Carmely, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R. & Sukenik, A. 1997. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from lake Kinneret. *Israel Journal of Phycology*. 33: 613–616.
- Banker, R., Teltsch, B., Sukenik, A. & Carmeli, S. 2000. 7-Epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from lake Kinneret, *Israel Journal of Natural Products*. 63: 387-389.
- Bazin, E., Mourot, A., Humpage, A. R. & Fessard, V. 2010 Genotoxicity of a freshwater cyanotoxin, cylindrospermopsin, in two human cell lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental Molecular Mutagenesis*. 51: 251–259
- Bergmeyer, H. U., Gawehn, K. & Grassl, M. 1974. Enzymes as biochemical reagents. *Methods of Enzymatic Analysis*. 1: 425-522.
- Beyer, D., Surányi, G., Vasas, G., Roszik, J. & Erdődi, F. 2009. Cylindrospermopsin induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (*Phragmites australis*) plantlets cultured *in vitro*. *Toxicon*. 54: 440-449.

Biehler, E., Mayer, F., Hoffmann, L., Krause, E. & Bohn, T. 2010. Comparison of 3 spectrophotometric methods for carotenoid determination in frequently consumed fruits and vegetables. *Journal of Food Science*. 75: 55-61.

Bibo, L., Yan, G., Bangding, X., Jiantong, L. & Yongding, L. 2008. A laboratory study on risk assessment of microcystin-RR in cropland. *Journal of Environmental Management*. 86: 566-574.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantifiers of proteins, utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

Braseir, M. D., Green, O. R., Jephcoat, A. P., Kleppe, A. K., Van Kranendonk, M. J., Lindsay, J. F., Steele, A. & Grassineau, N.V. 2002. Questioning the evidence for Earth's oldest fossils. *Nature*. 416: 76-81.

Braun-Howland, E. B. & Nierzwicki-Bauer, A. 1990. Occurrence of the 32-kDa Q_B – binding protein of photosystem II in vegetative cells, heterocysts and akinetes of *Azolla caroliniana* cyanobionts. *Planta*. 180: 361-371.

Campos, A., Araújo, P., Pinheiro, C., Azevedo, J., Osório, H. & Vasconcelos, V. 2013. Effects on growth, antioxidant enzyme activity and levels of extracellular proteins in the green alga *Chlorella vulgaris* exposed to crude cyanobacterial extracts and pure microcystin and cylindrospermopsin. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 94: 45-53.

Carmichael, W. W., Beasley, V., Bunner, D. L., Eloff, J. N., Falconer, I., Gorham, P., Harada, K.-i., Krishnamurthy, T., Min-Juan, Y., Moore, R.E., Rinehart, K., Runnegar, M., Skulberg, O.M. & Watanabe, M. 1988. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*. 26: 971-973.

Carrapiço, F. 2010. *Azolla* as a superorganism. It's implication in symbiotic studies. In J. Seckbach & M. Grube (Eds.), *Symbioses and Stress: Join Ventures in Biology, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. Springer Science+Business Media B.V. Dordrecht. Pp 225 - 241.

Carlberg, I. & Mannervick B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biology and Chemistry*. 250: 5475-5480.

Chen, J.Z., Dai, E., Gan, N.Q., Liu, Z.L. & Song, L.R. 2004. Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Toxicon*. 43: 393-400.

Chia, M. A., Lombardi, A. T. & Melao, M. D. G. G. 2013. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 85: 1427-1438.

Chiswell, R.K., Shaw, G.R., Eaglesham, G., Smith, M.J., Norris, R.L., Seawright, A.A. & Moore, M.R. 1999. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: Effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. *Environmental Toxicology*. 14: 155-161.

Chu, W., See, Y. & Phang, S. 2009. Use of immobilized *Chlorella vulgaris* for the removal of colour from textile dyes. *Journal of Applied Phycology*. 21: 641-648.

Chu, F.F., Chu, P.N., Cai, P.J., Li, W.W., Lam, P.K.S. & Zeng, R.J., 2013. Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency. *Bioresource Technology* 134: 341–346.

Crush, J.R., Briggs, L.R., Sprosen, J.M. & Nichols, S.N. 2008. Effect of irrigation with lake water containing microcystins on microcystin content and growth of ryegrass, clover, rape and lettuce. *Environmental Toxicology*. 23: 246-252.

Cruz, A. A., Hiskia, A., Kaloudis, T., Chernoff, N., Hill, D., Antoniou, M. G., He X., Loftin, K., O'Shea, K., Zhao, C., Pelaez, M., Han, C., Lynch, T. J. & Dionysiou, D. D. 2013. *Environmental Science processes & Impacts*. 15: 1979-2003.

Dawson, R.M. 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicon*. 36: 953-962.

Ettoumi, A., El Khalloufi, F., El Ghazali, I., Oudra, B., Amrani, A., Nasri, H. & Bouaïcha, N. 2011. Bioaccumulation of cyanobacterial toxins in aquatic organisms and its consequences for public health. In: Kattel, G. (Ed.), *Zooplankton and Phytoplankton: Types, Characteristics and Ecology*. Nova Science Publishers Inc. New York. Pp 1–34.

Falconer, I. R. & Humpage, A. R. 2001. Preliminary evidence for in vivo tumor initiation by oral administration of extracts of the blue- green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology*. 16:

192–195.

Falconer, I. R. & Humpage, A. R. 2005. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2: 43-50.

Falconer, I. R. & Humpage, A.R. 2006. Cyanobacterial (Blue-Green algal) toxins in water supplies: Cylindrospermopsins. *Environmental Toxicology*. 21: 299-304.

Fischer, W. J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P. J., Dietrich, D. R. & Hagenbuch, B. 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 203: 257-263

Flohé L. & Günzler W.A. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*. 105:114-121.

Fu, J. & Huang, B. 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany*. 45: 105 - 114.

Gamble, P. E. & Burke, J. J. 1984. Effect of water stress on the chloroplast antioxidant system I. Alterations in glutathione reductase activity. *Plant Physiology*. 76: 615-621.

Gao, Q. T., Wong, Y. S. & Tam, N.F.Y. 2011. Removal and biodegradation of nonylphenol by different *Chlorella* species. *Marine Pollution Bulletin*. 63: 445–451.

Góth, L. 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*. 196: 143-151.

Gutiérrez-Praena, D., Pichardo, S., Moyano, R., Blanco, A., Monterde, J. G. & Cameán, A. M. 2012. Time-dependent histopathological changes induced in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) after acute exposure to pure cylindrospermopsin by oral and intraperitoneal route. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 76:102–113.

Gutiérrez-Praena, D., Jos, Á., Pichardo, S., Moreno, I. M. & Cameán, A. M. 2013. Presence and bioaccumulation of microcystins and cylindrospermopsin in food and the effectiveness of some cooking techniques at decreasing their concentrations: A review. *Food and Chemical Toxicology*. 53: 139-152.

Guzman, R.E., Solter, P.F. & Runnegar, M.T. 2003. Inhibition of nuclear protein phosphatase activity in mouse hepatocytes by the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Toxicon*. 41: 773-781.

Habig, W.H., Pabst, M.J. & Jakoby, W.B. 1974. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 249: 7130-7139.

Halliwell, B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*. 97: 1634-1658.

Kaplan, D., Calvert, H.E. & Peters, G.A. 1986. The *Azolla-Anabaena azollae* relationship. XII. Nitrogenase activity and phycobiliproteins of the endophyte as a function of leaf age and cell type. *Plant Physiology*. 80: 884-890.

Harada, K.I., Ohtani, I., Iwamoto, K., Suzuki, M., Watanabe, M., Watanabe, F. & Terao, K., 1994. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon*. 32: 73-84.

Hill, M. P. & Cilliers, C. J. 1999. A review of the arthropod natural enemies, and factors that influence their efficacy, in the biological control of water hyacinth, *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms-Laubach (Pontederiaceae), in South Africa. *Biological Control of Weeds in South Africa (1990–1998)*. 1: 103– 112.

Hitzfeld, B. C., Hoger, S. J. & Dietrich, D. R. 2000. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environmental Toxicology*. 108: 113-122.

Honkanen, R. E., Zwiller, J., Moore, R. E., Daily, S. L., Khatra, B. S., Dukelow, M. & Boynton, A. L. 1990. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *The Journal of Biological Chemistry*. 265: 19401-19404.

Hori, K., Ishii, S., Ikeda, G., Okamoto, J., Tanji, Y., Weeraphasphong, C. & Unno, H. 2002. Behavior of filamentous cyanobacterium *Anabaena* spp. in water column and its cellular characteristics. *Biochemical Engineering Journal*. 20: 217-225.

Humpage, A. R., Fenech, M., Thomas, P. & Falconer, I. R. 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate

clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutagenic Research*. 472:155–161.

Ibelings, B. W. & Chorus, I. 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: a review. *Environmental Pollution*. 150: 177-192.

Illman, A. M., Scragg, A. H. & Shales, S. W. 2000. Increase in *Chlorella vulgaris* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*. 27: 631-635.

Ikawa, M., Sasner, J.J. & Haney, J.F. 2001. Activity of cyanobacterial and algal odor compounds found in lake waters on green alga *Chlorella pyrenoidosa* growth. *Hydrobiologia*. 443: 19-22.

Karjalainen, M., Reinikainen, M., Lindvall, F., Spoof, L. & Meriluoto, J.A.O. 2003. Uptake and accumulation of dissolved, radiolabeled nodularin in Baltic Sea zooplankton. *Environmental Toxicology*. 18: 52-60.

Kearns, K. D. & Hunter, M. D. 2000. Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium. *Environmental Microbiology*. 2: 291-297.

Kinnear, S. H. W., Fabbro, L. D., Duivenvoorden, L. J. & Hibberd, E. M. A. 2007. Multiple-organ toxicity resulting from cylindrospermopsin exposure in tadpoles of the cane toad (*Bufo marinus*). *Environmental Toxicology*. 22: 550-558.

Kinnear, S. H. W., Fabbro, L. D. & Duivenvoorden, L. J. 2008. Variable growth responses of water thyme (*Hydrilla verticillata*) to whole-cell extracts of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 54: 187–194.

Kittler, K., Schreiner, M., Krumbein, A., Manzei, S., Koch, M., Rohn, S. & Maul, R., 2012. Uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in *Brassica* vegetables. *Food Chemistry*. 133: 875-879.

Kotai, J. 1972. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. NIVA B-11/69.

Kuiper-Goodman, T., Falconer, I. & Fitzgeralds, J. 1999. Human health aspects. In Chorus I, Bartam J (Eds). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. WHO, Geneve. Pp 113-160.

Lau, P. S., Tam, N. F. Y. & Wong, Y. S. 2010. Wastewater nutrients removal by *Chlorella vulgaris*: optimization through acclimation. Environmental Technology. 17: 183-189.

Lawton, L.A., Edwards, C. & Codd, A. 1994. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. Analyst. 119: 1525-1530.

Li, R., Wayne, W. C., Scott, B., Geoffrey, K. E., Glen, R. S., Yongding, L. & Makoto, M. W. 2001. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (cyanobacteria), Journal of Phycology. 37: 1121–1126.

Li, X.Y., Liu, Y.D., Song, L.R. & Liu, H.T. 2003. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. Toxicon. 42: 85-89.

Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C. Q. & Dubois-Calero, N. 2008. Biofuels from microalgae. Biotechnology Progress. 24: 815-820.

Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids-pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology. 148: 350-382.

Lichtenthaler, H. K. & Buschman, C. 2001. Chlorophylls and carotenoids: Measurment and characterization by UV-VIS Spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, F4.3.1 – F4.3.8.

Lim, S., Chu, W. & Phang, S. 2010. Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. Bioresource Technology. 101: 7314-7322.

Lumpkin, T. A. & Plucknett, D. L. 1980. *Azolla*: botany, physiology, and use as a green manure. Economic Botany. 34: 111-153.

MacKintosh, C., Beattie, K. A., Klumpp, S., Cohen, P. & Codd, G. A. 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein

phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. FEBS Letters. 264: 187-192.

Masini, M. R., Penteado, J. C. P. & Masini, J. C. 2012. Study of photorespiration in marine microalgae through the determination of glycolic acid using hydrophilic interaction liquid chromatography. Journal of Separation Science. 35: 20-28.

Masood, A., Shah, N. A., Zeeshan, M. & Abraham, G. 2006. Differential response of antioxidant enzymes to salinity stress in two varieties of *Azolla* (*Azolla pinnata* and *Azolla filiculoides*). Environmental and Experimental Botany. 58: 216-222.

Mashkani, S. G. & Ghazvini, P. T. M. 2009. Biotechnological potential of *Azolla filiculoides* for biosorption of Cs and Sr: Application of micro-PIXE for measurement of biosorption. Bioresource Technology. 100: 1915-1921.

Metcalf, J. S., Barakate, A. & Codd, G. A. 2004. Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. FEMS Microbiology Letters. 235: 125-129.

Mitrovic, S.M., Allis, O., Furey, A. & James, K.J., 2005. Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chladophora fracta*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 61: 345–352.

Mohamed, Z.A. 2008. Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem. Ecotoxicology. 17: 504-516.

Ohtani, I., Moore, R.E. & Runnegar, M.T.C., 1992. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. Journal of the American Chemical Society. 114: 7941–7942.

O’Neil, J. M., Davis, T. W., Burford, M. A. & Gobler, C. J. 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. Harmful Algae. 14: 313-334.

Papke, U., Gross, E. M. & Francke, W. 1997. Isolation, identification and determination of the absolute configuration of Fischerellin B. A new algicide from the freshwater cyanobacterium *Fischerella muscicola* Thuret). Tetrahedron Letters. 38:

379-382.

Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R. & Neilan, B., 2010. On the chemistry toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins microcystin nodularin saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine Drugs*. 8: 1650–1680.

Pereira, A.L. & Carrapiço, F. 2009. Culture of *Azolla filiculoides* in artificial conditions. *Plant Biosystems*. 143: 431 - 434.

Pereira, A. L. & Vasconcelos V. 2014. Classification and phylogeny of the cyanobiont *Anabaena azollae* Strasburger: an answered question? *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64: 1830-1840.

Pinheiro, C., Azevedo, J., Campos, A., Loureiro, S. & Vasconcelos, V. 2013. Absence of negative allelopathic effects of cylindrospermopsin and microcystin-LR in selected marine and freshwater phytoplankton species. *Hydrobiologia*. 705: 27-42.

Poniedzialek, B., Rzymiski, P. & Karczewski, J., 2014. Cylindrospermopsin decreases the oxidative burst capacity of human neutrophils. *Toxicon*. 87: 113-119.

Pflugmacher, S., Wiegand, C., Beattie, K. A., Krause, E., Steinberg, C. E. & Codd, G. A. 2001. Uptake, effects, and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant *Phragmites australis* (cav.) trin. ex steud. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20: 846-852.

Pflugmacher, S. 2002. Possible allelopathic effects of cyano- toxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology*. 17: 407–413.

Pflugmacher, S. 2004. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Aquatic Toxicology*. 70: 169- 178.

Prieto, A., Campos, A., Cameán, A. & Vasconcelos, V. 2011. Effects on growth and oxidative stress status of rice plants (*Oryza sativa*) exposed to two extracts of toxin-producing cyanobacteria (*Aphanizomenon ovalisporum* and *Microcystis aeruginosa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74: 1973-1980.

Radmer, R. J. & Parker B. C. 1994. Commercial applications of algae: opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*. 6:93-98.

Rakhshae, R., Khosravi, M. & Ganji, M. T. 2006. Kinetic modeling and

thermodynamic study to remove Pb (II), Cd (II), Ni (II) and Zn (II) from aqueous solution using dead and living *Azolla filiculoides*. Journal of Hazardous Materials. 134: 120-129.

Rattanapoltee, P. & Kaewkannetra, P. 2014. Cultivation of microalgae, *Chlorella vulgaris* under different auto–hetero–mixo trophic growths as a raw material during biodiesel production and cost evaluation. Energy. DOI: 10.1016/j.energy.2014.06.049.

Rocha, A. C. S., Almeida, C. M. R., Basto, M. C. P., & Vasconcelos, M. T. S. D. 2013. SPE sample pre-treatment using a mixed mode sorbent of reverse-phase and ionic exchange for determination of ALMWOAs in waters. International Journal of Environmental and Analytical Chemistry. 94: 233-246.

Romanowska-Duda, Z., Mankiewicz, J., Tarczńska, M., Walter, Z. & Zalewski, M. 2002. The effect of toxic cyanobacteria (Blue-green algae) on water plants and animal cells. Polish Journal of Environmental Studies. 11: 561-566.

Rumanan, S., J. Tang & A. Velayudhan, 2000. Isolation and preparative purification of microcystin variants. Journal of Chromatography A 883: 103–112.

Runnegar, M. T., Kong, S. M., Zhong, Y. Z., Ge, J. L. & Lu, S. C. 1994. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications. 201: 235-241.

Runnegar, M. T., Xie, C. Y., Snider, B. B., Wallace, G. A., Weinreb, S. M. & Kuhlenkamp, J. 2002. *In vitro* hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. Toxicological Sciences. 67: 81-87.

Safi, C., Zebib, B., Merah, O. & Pontalier, P. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 35: 265-278.

Saqrane, S., El ghazali, I., Ouhid, Y., El Hassni, M., El Hadrami, I., Bouarad, L., del Campo, F. F., Oudra, B. & Vasconcelos, V. 2007. Phototoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemna gibba*: Microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction. Aquatic Toxicology. 83:284-294.

Saker, M. L., Nogueira, I. C. G., Vasconcelos, V. M., Neilan, B. A., Eaglesham, G. K. & Pereira, P. 2003. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 55: 243–250.

Saqrane, S., Ghazali, I.E., Ouahid, Y., Hassni, M. E., Hadrami, I. E., Bouarab, L., del Campo, F. F., Oudra, B. & Vasconcelos, V. 2007. Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemna gibba*: Microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction. *Aquatic Toxicology*. 83: 284-294.

Saqrane, S., Ghazali, I. E., Oudra, B., Bouarab, L. & Vasconcelos, V. 2008. Effects of cyanobacteria producing microcystins on seed germination and seedling growth of several agricultural plants. *Journal of Environmental Science and Health Part B*. 43: 443-451.

Seifert, M., McGregor, G., Eaglesham, G., Wickramasinghe, W. & Shaw, G. 2007. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae*. 6: 73–80.

Sedmak, B. & Kosi, G. 1998. The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation. *Journal of Plankton Research*. 20: 691-708.

Sela, M., Garty, J. & Tel-Or, E. 1989. The accumulation and the effect of heavy metals on the water fern *Azolla filiculoides*. *New Phytologist*. 112: 7-12.

Singh, O. V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R. & Jain, R. K. 2003. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61: 405-412.

Song, U., Park, H. & Lee, E. J. 2012. Ecological responses and remediation ability of water fern (*Azolla japonica*) to water pollution. *Journal of Plant Biology*. 55: 381-389.

Shaw, G. R., Seawright, A. A., Moore, M. R. & Lam, P.K. 2000. Cylindrospermopsin, A cyanobacterial alkaloid: evaluation of its toxicologic activity. *Therapeutic Drug Monitoring*. 22: 89–92.

Shembri, M. A., Neilan, B. A. & Saint, C. P., 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Environmental Toxicology. 16: 413–421

Shi, D. J. & Hall, D. O. 1988. The *Azolla-Anabaena* association: Historical perspective, symbiosis and energy metabolism. The Botanical Review. 54: 353-386.

Stüven, J. & Pflugmacher, S. 2007. Antioxidative stress response of *Lepidium sativum* due to exposure to cyanobacterial secondary metabolites. Toxicon. 50: 85-93.

Toivola, D. M. & Eriksson, J. E. 1999. Toxins affecting cell signaling and alteration of cytoskeletal structure. Toxicology in Vitro. 13: 521-530

Vafaei, F., Khataee, A. R., Movafeghi, A., Salehi Lisar, S. Y. & Zarei, M. 2012. Bioremoval of an azo dye by *Azolla filiculoides*: Study of growth, photosynthetic pigments and antioxidant enzymes status. International Biodeterioration & Biodegradation. 75: 194-200.

van Apeldoorn, M.E., Egmond, V., H.P., Speijers, G.J.A. & Bakker, G.J.I. 2007. Toxins of cyanobacteria. Molecular Nutrition & Food Research. 51: 7-60.

Vasconcelos, V.M., Sivonen, K., Evans, W.R., Carmichael, W.W. & Namikoshi, M. 1995. Isolation and characterization of microcystins (heptapeptide hepatotoxins) from Portuguese strains of *Microcystis aeruginosa* Kutz. emed Elekin. Archiv für Hydrobiologie. 134: 295 - 305.

Vasconcelos, V. 2001. Cyanobacteria toxins: diversity and ecological effects. Limnetica. 20: 45 - 48.

Welker, M., Bickel, H. & Fastner J. 2002. HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin—opportunities and limits. Water Research. 36: 4659–4663.

Wiegand, C., Peuthert, A., Pflugmacher, S. & Carmeli, S. 2002. Effects of microcin SF608 and microcystin-LR, two cyanobacterial compounds produced by *Microcystis sp.*, on aquatic organisms. Environmental Toxicology. 17: 400-406.

Wiegand, C. & Pflugmacher, S. 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. Toxicology and Applied Pharmacology. 203: 201–218.

White, S. H., Duivenvoorden, L. J., Fabbro, L. D. & Eaglesham, G. K. 2006. Influence

of intracellular toxin concentration on cylindrospermopsin bioaccumulation in freshwater gastropod (*Melanoides tuberculata*). *Toxicon*. 47: 497–509.

Yamamoto, M., Fujishita, M. & Hirata A. 2004. Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Journal Plant Research*. 117: 257-264.

Yin, L., Huang, J., Huang, W., Li, D., Wang, G. & Liu, Y. 2005. Microcystin-RR induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in tobacco BY-2 cells. *Toxicon*. 46: 507-512.

Zhao, M., Duncan, J. R. & Van Hille, R. P. 1999. Removal and recovery of zinc from solution and electroplating effluent using *Azolla filiculoides*. *Water Research*. 33: 1516-1522.

Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J.